

Aus dem Institut für Chemie und Technologie der Milch  
der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel

---

# **Synthese und Evaluierung molekular geprägter Polymere (MIP) als Sorbentien für lebensmittelanalytische Anwendungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M.Sc. Christina Schirmer  
aus Magdeburg

Kiel, Mai 2007

---

Dekan: Prof. Dr. Joachim Krieter  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Meisel  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elisabeth Wisker  
Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2007

Gedruckt mit der Genehmigung  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

# Danksagung

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit möchte ich besonders herzlich danken:

Herrn Prof. Dr. Hans Meisel für die Überlassung des interessanten Themas, seine wertvollen Hinweise und Ratschläge sowie die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Der Firma Applica GmbH in Bremen und insbesondere dem Geschäftsleiter Herrn Dr. Kurt-Peter Raezke und Dr. Daniela Grotewahl für die Unterstützung und Durchführung der online-SPE-LC-MS/MS-Untersuchungen.

Herrn Dr. habil. Börje Sellergren für den dreiwöchigen Aufenthalt in seinem Arbeitskreis an der Universität Dortmund und die dort erhaltenen wertvollen Hinweise zu molekular geprägten Polymeren.

Herrn Björn Neumann, der bei allen technischen Problemen mit der HPLC Antwort wusste und für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Enken Jacobsen, die bei der Durchführung der Arbeit behilflich war und dafür, dass ich mit ihr jederzeit über alles reden konnte.

Frau Dr. Ingrid Clawin-Rädecker und Herrn Dr. Dierk Martin für die Anregungen bei methodischen Fragestellungen.

Herrn Dr. Horst Neve für die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Den Mitarbeitern des Institutes und insbesondere Bozena Grümmer, Angelika Raabe, Andrea Schwall für ihre stetige Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Meiner Mutter und meinem Vater sowie meinem Partner Jörn, die mich in allem unterstützten und immer hinter mir standen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Problemstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Molekular geprägte Polymere .....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Molekularer Prägungsprozess .....	3
2.1.1.1. Nicht kovalente Prägung .....	4
2.1.1.2. Kovalente Prägung .....	4
2.1.1.3. Polymerisation .....	4
2.1.2. Bestandteile des Präpolymers .....	5
2.1.2.1. Templat .....	5
2.1.2.2. Funktionelles Monomer .....	6
2.1.2.3. Quervernetzer .....	8
2.1.2.4. Initiator .....	9
2.1.2.5. Porogen .....	10
2.1.3. Eigenschaften der MIPs .....	11
2.1.3.1. Morphologie .....	11
2.1.3.2. Vor- und Nachteile .....	12
2.1.4. Wiedererkennung des Templats .....	13
2.1.4.1. Bindungsstellen .....	13
2.1.4.2. Mediumabhängige Wiederbindung des Templats .....	15
2.1.5. Mini-MIPs .....	16
2.1.6. Methoden zur MIP-Synthese .....	18
2.1.6.1. Bulk-Polymerisation .....	19
2.1.6.2. Polymerisation in vorgeformten Partikeln .....	20
2.1.6.2.1. Prägung in vorgeformten Partikeln .....	20
2.1.6.2.2. Hierarchische Prägung .....	21
2.1.6.3. Polymer-Monolith .....	22
2.1.6.4. Fällungs-Polymerisation .....	22
2.1.6.5. Dispersions-Polymerisation .....	23
2.1.6.6. Suspensions-Polymerisation .....	23
2.1.6.7. Multi-Step-Swelling-Polymerisation .....	25
2.1.6.8. Core-Shell-Emulsions-Polymerisation .....	26
2.1.7. Anwendungsbereiche für MIPs .....	26
2.1.7.1. Festphasenextraktion .....	26
2.1.7.2. Andere Anwendungsbereiche .....	29
<b>2.2. Chloramphenicol .....</b>	<b>30</b>
2.2.1. Struktur und Wirkung .....	30
2.2.2. Verwendung und Nebenwirkungen .....	31
2.2.3. Rechtliche Grundlagen .....	33
2.2.4. Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol .....	33
2.2.5. MIP-basierte Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol .....	35
<b>2.3. Nisin .....</b>	<b>37</b>
2.3.1. Struktur und Wirkung .....	37
2.3.2. Verwendung .....	39

2.3.2.1. Konservierung von Lebensmitteln .....	39
2.3.2.2. Medizinische Applikationen .....	39
2.3.3. Toxizität .....	40
2.3.4. Rechtliche Grundlagen .....	40
2.3.5. Methoden zur Bestimmung von Nisin .....	41
<b>2.4. Bioaktive Peptide .....</b>	<b>42</b>
2.4.1. Wirkung und Bedeutung .....	42
2.4.2. MIP-basierte Methoden zur Bestimmung von Peptiden .....	45
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Material .....</b>	<b>48</b>
3.1.1. Chemikalien .....	48
3.1.1.1. Chemikalien zur Synthese .....	48
3.1.1.2. Chemikalien zur Analyse .....	49
3.1.2. Geräte .....	50
3.1.2.1. Geräte allgemein .....	50
3.1.2.2. Geräte zur Synthese .....	50
3.1.2.3. Geräte zur Analyse .....	51
3.1.2.4. Geräte zur Analyse bei der Firma ApplicA GmbH .....	52
<b>3.2. Methoden .....</b>	<b>52</b>
3.2.1. Chemikalienaufreinigung .....	52
3.2.2. Bulk-Polymerisation .....	53
3.2.3. Hierarchische Prägung .....	54
3.2.3.1. Einbringung von Aminogruppen auf die Silicageloberfläche .....	55
3.2.3.2. Immobilisation Fmoc-geschützter Aminosäuren oder Peptide an die Silicagel-Amin-Oberfläche .....	56
3.2.3.3. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe .....	57
3.2.3.4. Polymerisation in den Silicagelporen .....	57
3.2.3.5. Herauslösen des Silicagels aus dem Silicagel/Polymer-Gemisch .....	57
3.2.3.6. Synthetisierte hierarchisch geprägte Polymere .....	58
3.2.3.7. Elementaranalyse .....	60
3.2.4. HPLC-Analysen .....	61
3.2.4.1. Chromatographische Evaluierung .....	61
3.2.4.2. Bestimmung der Wiederfindung nach Festphasenextraktion .....	62
3.2.5. Manuelle Festphasenextraktion .....	64
3.2.6. Online-SPE-LC-MS/MS .....	64
3.2.6.1. Online-Festphasenextraktion .....	64
3.2.6.2. LC-Trennsystem .....	65
3.2.6.3. Detektion mittels Triple Quadrupole – Massenspektrometer .....	65
3.2.6.4. Auswertung .....	66
3.2.7. Probenvorbereitung .....	67
3.2.7.1. Honigprobenvorbereitung zur manuellen Festphasenextraktion .....	67
3.2.7.2. Probenvorbereitung zur online-SPE-LC-MS/MS .....	67
3.2.8. Rasterelektronenmikroskopie .....	69
<b>4. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Chloramphenicol geprägte Polymere zur Separation von Chloramphenicol ....</b>	<b>70</b>

4.1.1. Chromatographische Evaluierung .....	71
4.1.1.1. Retention des Chloramphenicols .....	71
4.1.1.1.1. Einfluss der mobilen Phase .....	71
4.1.1.1.2. Einfluss des funktionellen Monomers .....	73
4.1.1.2. Prägungseffekt gegenüber Chloramphenicol .....	74
4.1.1.2.1. Einfluss der mobilen Phase .....	74
4.1.1.2.2. Einfluss des funktionellen Monomers .....	77
4.1.1.3. Separation des Chloramphenicols .....	77
4.1.1.3.1. Retention des Florfenicols und Thiamphenicols .....	77
4.1.1.3.2. Einfluss der mobilen Phase .....	80
4.1.1.3.3. Einfluss des funktionellen Monomers .....	84
4.1.1.4. Zusammenfassende Betrachtung .....	84
4.1.2. Manuelle Festphasenextraktion .....	87
4.1.2.1. Standardverdünnungsreihe vom Chloramphenicol .....	88
4.1.2.2. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen .....	89
4.1.2.3. Waschen mit Acetonitril .....	92
4.1.2.4. Waschen mit Ethylacetat .....	93
4.1.2.5. Festphasenextraktion von Honigproben .....	97
4.1.2.6. Zusammenfassende Betrachtung .....	102
4.1.3. Online-SPE-LC-MS/MS .....	103
4.1.3.1. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen .....	104
4.1.3.2. Waschen mit apolaren Lösemittelmischungen .....	110
4.1.3.3. Zusammenfassende Betrachtung .....	112
<b>4.2. Florfenicol und Thiamphenicol geprägte Polymere zur Separation von Chloramphenicol .....</b>	<b>113</b>
4.2.1. Chromatographische Evaluierung .....	113
4.2.1.1. Retention des Chloramphenicols .....	113
4.2.1.1.1. Einfluss der mobilen Phase .....	113
4.2.1.1.2. Einfluss der molekularen Prägung .....	116
4.2.1.2. Prägungseffekt gegenüber Chloramphenicol .....	117
4.2.1.2.1. Einfluss der mobilen Phase .....	117
4.2.1.2.2. Einfluss der molekularen Prägung .....	119
4.2.1.3. Separation des Chloramphenicols .....	120
4.2.1.3.1. Retention des Florfenicols und Thiamphenicols .....	120
4.2.1.3.2. Einfluss der mobilen Phase .....	123
4.2.1.3.3. Einfluss der molekularen Prägung .....	127
4.2.1.4. Zusammenfassende Betrachtung .....	127
4.2.2. Manuelle Festphasenextraktion .....	129
4.2.2.1. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen .....	129
4.2.2.2. Waschen mit apolaren Lösemitteln .....	130
4.2.2.3. Zusammenfassende Betrachtung .....	133
<b>4.3. Nisin C-terminal geprägte Polymere zur Separation von Nisin .....</b>	<b>134</b>
4.3.1. Elementaranalyse .....	134
4.3.2. Chromatographische Evaluierung .....	136
4.3.2.1. Retention des Nisins .....	136
4.3.2.1.1. Einfluss der mobilen Phase .....	136
4.3.2.1.2. Einfluss der molekularen Prägung .....	138
4.3.2.2. Prägungseffekt gegenüber Nisin .....	139
4.3.2.3. Separation des Nisins .....	140

4.3.2.4.	C-Terminus und C-terminal analoge Aminosäuresequenzen des Nisins .....	141
4.3.2.4.1.	Retention von Lysin und Lys-Ala .....	141
4.3.2.4.2.	Prägungseffekt gegenüber Lysin und Lys-Ala .....	144
4.3.2.4.3.	Separation von Lysin und Lys-Ala .....	146
4.3.2.5.	Zusammenfassende Betrachtung .....	149
4.3.3.	Manuelle Festphasenextraktion .....	151
4.3.3.1.	Standardverdünnungsreihe vom Nisin .....	151
4.3.3.2.	Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen .....	153
4.3.3.3.	Waschen mit Acetonitril und Acetonitril mit geringen Wasser- Anteil .....	154
4.3.3.4.	Waschen mit Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) .....	155
4.3.3.4.1.	Einfluss der Nisin-Konzentration auf die Wiederfindung .....	155
4.3.3.4.2.	Einfluss des Volumens der Waschlösung auf die Wiederfindung .....	156
4.3.3.4.3.	Einfluss der Verfahren zur Probenaufbereitung auf die Wiederfindung .....	157
4.3.3.5.	Zusammenfassende Betrachtung .....	158
<b>4.4.</b>	<b>Ala-Gly geprägte Polymere zur Separation von Ala-Gly .....</b>	<b>160</b>
4.4.1.	Elementaranalyse .....	160
4.4.2.	Chromatographische Evaluierung .....	161
4.4.2.1.	Retentionsfaktoren .....	161
4.4.2.1.1.	Retention von Alanin und Ala-Gly .....	161
4.4.2.1.2.	Retention von Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly .....	164
4.4.2.2.	Prägungsfaktoren .....	166
4.4.2.2.1.	Prägungseffekt gegenüber Alanin und Ala-Gly .....	166
4.4.2.2.2.	Prägungseffekt gegenüber Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly .....	168
4.4.2.3.	Separation der nicht Fmoc-geschützten und Fmoc-geschützten Aminosäuren und Peptide .....	170
4.4.2.4.	Zusammenfassende Betrachtung .....	171
<b>4.5.</b>	<b>Rasterelektronenmikroskopie .....</b>	<b>173</b>
<b>5.</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick .....</b>	<b>180</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>184</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>190</b>
<b>A.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>205</b>
A.1.	Chloramphenicol geprägte Polymere .....	205
A.2.	Florfenicol und Thiamphenicol geprägte Polymere .....	211
A.3.	Nisin C-terminal analog geprägte Polymere .....	213
A.4.	Ala-Gly geprägte Polymere .....	215



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1:	Schematische Darstellung des molekularen Prägnungsprozesses .....	3
Abb. 2-2:	Zur MIP-Synthese häufig verwendete funktionelle Monomere .....	7
Abb. 2-3:	Zur MIP-Synthese häufig verwendete Quervernetzer .....	9
Abb. 2-4:	Modell der Morphologie eines porösen Polymernetzwerkes .....	11
Abb. 2-5:	Verschiedene Bindungsstellentypen in MIPs .....	14
Abb. 2-6:	Synthese und Evaluierung von mini-MIPs .....	17
Abb. 2-7:	MIP-Synthese mittels Bulk-Polymerisation .....	20
Abb. 2-8:	MIP-Synthese mittels hierarchischer Prägnung .....	21
Abb. 2-9:	Schematische Darstellung einer Festphasenextraktion .....	27
Abb. 2-10:	Struktur von Nisin A .....	37
Abb. 2-11:	Milch stellt eine biologische aktive Flüssigkeit dar, die regulatorische Proteine und Peptide enthält .....	43
Abb. 4-1:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den Polymeren, die mit dem funktionellen Monomer 2VPy, DEAEMA oder MAA synthetisiert wurden .....	72
Abb. 4-2:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols auf den verschiedenen MIPs .....	74
Abb. 4-3:	Prägnungsfaktoren des Chloramphenicols unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den Polymeren, die mit dem funktionellen Monomer 2VPy, DEAEMA oder MAA synthetisiert wurden .....	75
Abb. 4-4:	Prägnungsfaktoren des Chloramphenicols auf den verschiedenen MIPs .....	77
Abb. 4-5:	Retentionsfaktoren des Florfenicols und Thiamphenicols .....	78
Abb. 4-6:	Separationsfaktoren des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol .....	82
Abb. 4-7:	Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(CAP_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril oder Acetonitril/Wasser (25:75; v/v) als mobile Phase .....	83
Abb. 4-8:	Kalibrierungskurve vom Chloramphenicol .....	89
Abb. 4-9:	Chromatogramme (RP18-HPLC) erhalten nach Festphasenextraktion von Honigproben (Waschen mit 3 ml Ethylacetat) auf dem Sorbent P(CAP_2VPy) .....	100
Abb. 4-10:	Chromatogramme (RP18-HPLC) erhalten nach Festphasenextraktion von Honigproben (Waschen mit 5 ml Methanol/Wasser (5:95; v/v)) auf dem Sorbent P(CAP_2VPy) .....	101
Abb. 4-11:	Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit Chloramphenicol unbelasteten Propolisprobe, wobei als SPE-Sorbent P(CAP_2VPy) und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente .....	107
Abb. 4-12:	Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit Chloramphenicol unbelasteten Propolisprobe, wobei als online-SPE-Sorbent ein RP18-Material und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente .....	108

Abb. 4-13:	Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit 0,3 µg Chloramphenicol dotierten Honigprobe, wobei als online-SPE-Sorbent P(MAA) und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente .....	109
Abb. 4-14:	Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit 0,3 µg Chloramphenicol dotierten Honigprobe, wobei als online-SPE-Sorbent ein RP18-Material und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente .....	110
Abb. 4-15:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den Polymeren, die mit Florfenicol, Thiamphenicol oder Chloramphenicol molekular geprägt wurden .....	114
Abb. 4-16:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	116
Abb. 4-17:	Prägungsfaktoren des Chloramphenicols unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den MIPs, die mit Florfenicol, Thiamphenicol oder Chloramphenicol molekular geprägt wurden .....	118
Abb. 4-18:	Prägungsfaktoren des Chloramphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	120
Abb. 4-19:	Retentionsfaktoren des Florfenicols und Thiamphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	121
Abb. 4-20:	Separationsfaktoren des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	125
Abb. 4-21:	Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(FF_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril oder Methanol/Wasser (30:70; v/v) als mobile Phase .....	126
Abb. 4-22:	Retentionsfaktoren des Nisins auf dem Polymer P(Lys) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen .....	136
Abb. 4-23:	Retentionsfaktoren des Nisins auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	138
Abb. 4-24:	Prägungsfaktoren des Nisins auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	139
Abb. 4-25:	Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(Lys-Ala-Val) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (5:95; v/v) als mobile Phase .....	141
Abb. 4-26:	Retentionsfaktoren des Lysins und Lys-Ala auf dem Polymer P(Lys) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen .....	142
Abb. 4-27:	Retentionsfaktoren des Lysins und Lys-Ala auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	144
Abb. 4-28:	Retentionsfaktoren des Ala-Lys auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	146
Abb. 4-29:	Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(Lys) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (80:20; v/v) als mobile Phase .....	148
Abb. 4-30:	Vergleich der C-terminalen Nisin-Sequenz mit der hierarchisch geprägten Sequenz .....	150
Abb. 4-31:	Kalibrierungskurve vom Nisin .....	152
Abb. 4-32:	Retentionsfaktoren des Alanins und Ala-Gly unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den hierarchisch geprägten Polymeren .....	162

Abb. 4-33:	Retentionsfaktoren des Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den hierarchisch geprägten Polymeren .....	164
Abb. 4-34:	Prägungsfaktoren des Alanins und Ala-Gly unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den hierarchisch geprägten Polymeren .....	167
Abb. 4-35:	Prägungsfaktoren des Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den hierarchisch geprägten Polymeren .....	169
Abb. 4-36:	Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P <sub>B</sub> (Ala-Gly) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) oder Acetonitril/Wasser/ TFA (19,8:79,2:1; v/v) als mobile Phase .....	170
Abb. 4-37:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Bulk-Polymers P(CAP_MAA) .....	173
Abb. 4-38:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Bulk-Polymers P(TAP_2VPy) .....	174
Abb. 4-39:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des hierarchisch geprägten Polymers P(Lys-Ala-Val) .....	175
Abb. 4-40:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des zur hierarchischen Prägung verwendeten Ausgangsmaterials Silicagel A .....	176
Abb. 4-41:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hierarchisch geprägten Polymers P(Ala-Gly) .....	177
Abb. 4-42:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Aggregaten des hierarchisch geprägten Polymers P(Ala-Gly) .....	178
Abb. 5-1:	Vorgehensweise zur Entwicklung eines MIPs und dessen Anwendung in der Lebensmittelanalytik .....	180

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Oberfläche, Porenvolumen und durchschnittliche Porengröße von MIPs in Abhängigkeit vom verwendeten Porogen .....	12
Tab. 2-2:	Vor- und Nachteile von MIPs .....	12
Tab. 2-3:	Literaturbeispiele für die Verwendung von MIPs als SPE-Sorbent .....	28
Tab. 2-4:	Chloramphenicol und strukturähnliche Verbindungen .....	31
Tab. 2-5:	Literaturvergleich Chloramphenicol geprägter Polymere .....	35
Tab. 3-1:	Synthetisierte Bulk-Polymere .....	54
Tab. 3-2:	Eigenschaften der verwendeten Silicagele .....	58
Tab. 3-3:	Verwendete Chemikalien zur Immobilisation der Aminosäuresequenz an die Silicagel-Amin-Oberfläche .....	59
Tab. 3-4:	Volumina des Präpolymers .....	60
Tab. 3-5:	Gradientenprogramm zur HPLC-Trennung der SPE-Eluate von Honigproben .....	63
Tab. 3-6:	Gradientenprogramm zur HPLC-Trennung der SPE-Eluate von Nisin-Lösungen .....	63
Tab. 3-7:	online-SPE-Programm zur Probenaufbereitung .....	65
Tab. 3-8:	Gradientenprogramm zur LC-Trennung .....	65
Tab. 3-9:	Single-Reaktions-Mode der Massendetektion .....	66
Tab. 4-1:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols auf den verschiedenen MIPs .....	73
Tab. 4-2:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols auf den verschiedenen NIPs .....	73
Tab. 4-3:	Prägnungsfaktoren des Chloramphenicols auf den verschiedenen MIPs .....	76
Tab. 4-4:	Retentionsfaktoren des Florfenicols auf den verschiedenen MIPs .....	79
Tab. 4-5:	Retentionsfaktoren des Thiamphenicols auf den verschiedenen MIPs .....	79
Tab. 4-6:	Separation des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol auf den verschiedenen MIPs .....	80
Tab. 4-7:	Separation des Chloramphenicols bezogen auf Thiamphenicol auf den verschiedenen MIPs .....	81
Tab. 4-8:	Vergleich der Ergebnisse aus der chromatographischen Evaluierung zum Einfluss eines protischen Lösemittels im Acetonitril dieser Arbeit mit der Literatur .....	85
Tab. 4-9:	Vergleich der Ergebnisse aus der chromatographischen Evaluierung mit Acetonitril als mobile Phase dieser Arbeit mit der Literatur .....	86
Tab. 4-10:	Lineare Kalibrierung sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze vom Chloramphenicol .....	88
Tab. 4-11:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung unter Verwendung verschiedener Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösung .....	90
Tab. 4-12:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung unter Verwendung verschiedener Acetonitril/Wasser-Mischungen als Waschlösung .....	90
Tab. 4-13:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung unter Verwendung verschiedener Ethylacetat/Wasser-Mischungen als Waschlösung .....	91

Tab. 4-14:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung unter Verwendung von Acetonitril als Waschlösung .....	92
Tab. 4-15:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Chloramphenicol-Lösungen verschiedener Konzentration unter Verwendung von Acetonitril als Waschlösung .....	93
Tab. 4-16:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung unter Verwendung von Ethylacetat als Waschlösung .....	94
Tab. 4-17:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Chloramphenicol-Lösungen verschiedener Konzentration unter Verwendung von Ethylacetat als Waschlösung .....	95
Tab. 4-18:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung unter Verwendung von Ethylacetat, das geringe Mengen an Methanol oder Wasser enthielt, als Waschlösung .....	96
Tab. 4-19:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Honigproben, denen Chloramphenicol zugesetzt wurde .....	98
Tab. 4-20:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Honigproben, denen Chloramphenicol zugesetzt wurde, unter Verwendung verschiedener Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösung .....	99
Tab. 4-21:	Wiederfindung nach online-SPE-LC-MS/MS einer Chloramphenicol/Chloramphenicol-d5-Standardlösung unter Verwendung verschiedener Methanol/Wasser-Mischungen als SPE-Waschlösung und MIPs bzw. NIP als SPE-Sorbent .....	104
Tab. 4-22:	Darstellung der Templatausblutungen aus dem MIPs bzw. NIP, die als SPE-Sorbent dienten, während drei aufeinanderfolgenden Analysen mit der online-SPE-LC-MS/MS unter Verwendung einer Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) als SPE-Waschlösung .....	106
Tab. 4-23:	Chloramphenicol-Retention auf dem online-SPE-Sorbent P(CAP_2VPy) unter Verwendung verschiedener Acetonitril-Mischungen als SPE-Waschlösung .....	111
Tab. 4-24:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	115
Tab. 4-25:	Retentionsfaktoren des Chloramphenicols auf dem NIP P(2VPy) .....	115
Tab. 4-26:	Prägnungsfaktoren des Chloramphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	119
Tab. 4-27:	Retentionsfaktoren des Florfenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	122
Tab. 4-28:	Retentionsfaktoren des Thiamphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	123
Tab. 4-29:	Separationsfaktoren des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	124
Tab. 4-30:	Separationsfaktoren des Chloramphenicols bezogen auf Thiamphenicol auf den unterschiedlich geprägten Polymeren .....	124
Tab. 4-31:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung auf den Polymeren P(FF_2VPy) und P(TAP_2VPy), wobei verschiedene Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösungen dienten .....	130
Tab. 4-32:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung auf den Polymeren P(FF_2VPy) und P(TAP_2VPy), wobei Acetonitril oder Ethylacetat als Waschlösung diente .....	131

Tab. 4-33:	Wiederholbarkeit der Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung auf den Polymeren P(FF_2VPy) und P(TAP_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril oder Ethylacetat als Waschlösung .....	132
Tab. 4-34:	Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt der Vorstufen des Polymers P(Lys) .....	134
Tab. 4-35:	Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt der Nisin C-terminal analog geprägten Polymere .....	135
Tab. 4-36:	Separationsfaktoren des Nisins bezogen auf Lysin und Lys-Ala auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	140
Tab. 4-37:	Prägungsfaktoren des Lysins und Lys-Ala auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	145
Tab. 4-38:	Separationsfaktoren des Lysins bezogen auf Lys-Ala und Ala-Lys auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	147
Tab. 4-39:	Separationsfaktoren des Lys-Ala bezogen auf Lysin und Ala-Lys auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren .....	147
Tab. 4-40:	Lineare Kalibrierung sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze vom Nisin .....	152
Tab. 4-41:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Nisin-Lösung unter Verwendung von der Acetonitril/Wasser-Mischung (5:95; v/v) als Waschlösung .....	153
Tab. 4-42:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Nisin-Lösung unter Verwendung von Acetonitril oder Acetonitril mit geringen Wasser-Anteil als Waschlösung .....	154
Tab. 4-43:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Nisin-Lösungen verschiedener Konzentration unter Verwendung der Acetonitril/Wasser-Mischung (95:5; v/v) als Waschlösung .....	155
Tab. 4-44:	Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Nisin-Lösung unter Verwendung von verschiedener Volumina der Waschlösung Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) .....	156
Tab. 4-45:	Einfluss von Verfahren zur Probenaufbereitung auf die Nisin-Wiederfindung .....	157
Tab. 4-46:	Einfluss von Proteinfällungsmethoden auf die Nisin-Wiederfindung .....	157
Tab. 4-47:	Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt der hierarchisch geprägten Polymere P <sub>B</sub> (-), P <sub>B</sub> (Ala-Gly) und P <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly) sowie deren Vorstufen .....	161
Tab. 4-48:	Retentionsfaktoren des Alanins auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren .....	163
Tab. 4-49:	Retentionsfaktoren des Ala-Gly auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren .....	163
Tab. 4-50:	Retentionsfaktoren des Fmoc-Ala auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren .....	165
Tab. 4-51:	Retentionsfaktoren des Fmoc-Ala-Gly auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren .....	166
Tab. 4-52:	Prägungsfaktoren des Alanins und Ala-Gly auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren .....	167
Tab. 4-53:	Prägungsfaktoren des Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren .....	169

## Abkürzungsverzeichnis

AA	=	Allylamin
Abu	=	$\alpha$ -Aminobutylsäure
AcN	=	Acetonitril
AcOH	=	Essigsäure
AIBN	=	$\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril
Ala	=	Alanin
APS	=	3-Aminopropyltriethoxysilan
AS	=	Aminosäure
Boc	=	Butoxycarbonyl
c	=	Konzentration
CAP	=	Chloramphenicol
d <sub>5</sub>	=	5-fach deuteriert
DCM	=	Dichlormethan
Dha	=	Dehydroalanin
Dhb	=	Dehydrobutyrin
DIPEA	=	N,N-Diisopropylethylamin
DEAEMA	=	2-(Diethylamino)ethylmethacrylat
DMF	=	N,N-Dimethylformamid
EDMA	=	Ethylenglykoldimethacrylat
ESI	=	Electrospray-Ionisation
EtAc	=	Ethylacetat
FF	=	Florfenicol
Fmoc	=	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G	=	Silicagel/Polymer-Gemisch
Gly	=	Glycin
HEMA	=	2-Hydroxyethylmethacrylat
HMDS	=	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HOBt	=	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	=	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
ID	=	Innendurchmesser
IF	=	Prägungsfaktor (imprinting factor)
K	=	Retentionsfaktor
LC	=	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
Lys	=	Lysin
MAA	=	Methacrylsäure
mAU	=	Milliabsorptionseinheit (milli absorption unit)
MeOH	=	Methanol
MIP	=	molekular geprägtes Polymer (molecularly imprinted polymer)
Mot	=	Bewegung (motion)
MRPL	=	Mindestleistungsgrenze (minimum required performance limit)
MS/MS	=	Tandem-Massenspektroskopie
MW	=	Mittelwert
m/z	=	Masse/Ladung
n	=	Probenanzahl
NIP	=	nicht geprägtes Polymer (non imprinted polymer)
P	=	Polymer

PCA	=	Perchlorsäure
PTA	=	Wolframatophosphorsäure
PyBOP	=	(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium- hexafluorophosphat
r	=	Korrelationskoeffizient
REM	=	Rasterelektronenmikroskopie
RP	=	Umkehrphase (reversed phase)
Sar	=	Sarcosin
Si	=	Silicagel
SPE	=	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SSA	=	5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat
STDW	=	Standardabweichung
t	=	Retentionszeit
TAP	=	Thiamphenicol
TCA	=	Trichloressigsäure
TFA	=	Trifluoressigsäure
TRIM	=	Trimethylpropantrimethacrylat
V	=	Volumen
Val	=	Valin
2VPy	=	2-Vinylpyridin
v/v	=	Volumenverhältnis
$\alpha$	=	Separationsfaktor



## 1. Einleitung und Problemstellung

Die meisten Lebensmittel und biologischen Proben müssen vor der Analyse aufbereitet werden, um den Zielanalyten, der oftmals in geringer Konzentration vorliegt, aufzukonzentrieren sowie um Matrix, welche die analytische Trennung und Quantifizierung stören würde, zu entfernen. Die Anforderungen einer Festphasenextraktion, die ein Standardverfahren zur Analytenanreicherung und Aufreinigung von komplexen Matrices darstellt, können molekular geprägte Polymere (MIP) gut erfüllen. Die molekulare Prägung ist nach mehr als zwei Jahrzehnten wissenschaftlicher Forschung eine gut etablierte Methode zur schnellen Generation von porösen Materialien auf Polymerbasis, die eine hohe Affinität gegenüber einer vorgegebenen Verbindung haben. Für lebensmittelwissenschaftliche Fragestellungen wurden bisher nur wenige Anwendungen beschrieben. Die Synthese eines MIPs erfolgt durch Polymerisation eines funktionellen Monomers mit einem Quervernetzer in Anwesenheit eines Templatmoleküls, das dem Zielanalyten entspricht bzw. eine analoge Molekülstruktur zum Zielanalyten aufweist (Wulff, 1995; Kempe & Mosbach, 1995). Nach der Polymerisation wird das Templat entfernt, so dass in dem dreidimensionalen porösen Polymernetzwerk Kavitäten zurückbleiben, die in ihrer Größe, Form und sterischen Ausrichtung der funktionellen Gruppen komplementär zum Zielmolekül sind. Diese Bindungsstellen sind für die selektive Bindung des Zielanalyten verantwortlich, wobei der Wiedererkennungsprozess dem von Makrobiomolekülen, wie beispielsweise Antikörpern oder Enzymen, ähnlich ist, so dass MIPs oft als Analoga zu Immunoaffinitätsmaterialien beschrieben werden. Allerdings weisen die MIPs, auf Grund ihrer hohen chemischen und mechanischen Stabilität sowie der einfachen und kostengünstigen Synthese, deutliche Vorteile gegenüber den Immunoaffinitätsmaterialien auf.

Bei den Zielmolekülen, die in dieser Arbeit von Interesse waren, handelt es sich um die Verbindungen Chloramphenicol und Nisin sowie um bioaktive Peptidsequenzen. Chloramphenicol ist ein Breitbandantibiotikum, das allerdings toxische Eigenschaften gegenüber dem Knochenmark zeigt und daraus folgend reversible aber auch irreversible Störungen der Blutbildung verursacht (Holt et al., 1993). Daher ist dessen Anwendung bei Lebensmittel produzierenden Tieren innerhalb der Europäischen Union seit 1994 grundsätzlich verboten. Jedoch ist auf Grund der breiten Aktivität, der Verfügbarkeit und der geringen Kosten die Verwendung des Chloramphenicols zur prophylaktischen oder

therapeutischen Behandlung in einigen Ländern immer noch attraktiv. Das Polypeptid Nisin wird von verschiedenen *Lactococcus lactis* Stämmen gebildet und ist gegen eine Vielzahl von grampositiven Bakterien aktiv (Hansen, 1997). Deshalb wird Nisin beispielsweise in Käse als Konservierungsmittel eingesetzt. Weiterhin beinhaltet es ein großes Potential in der Entwicklung neuer Medikamente. Folglich ist die Anwendung von antimikrobiell wirksamen Substanzen zur Lebensmittelkonservierung grundsätzlich problematisch, da die Entwicklung resistenter Mikroorganismenstämme ihren Einsatz in der Medizin stören können. Bioaktive Peptide liegen in inaktiver Form in der Primärstruktur der höhermolekularen Proteine vor und werden erst durch enzymatische Spaltung als Fragmente aus den Proteinen freigesetzt und somit aktiviert (Meisel, 2005). Die reichste Quelle an bioaktiven Peptiden stellen die Milchproteine dar. Auf Grund der biologischen Aktivität ergeben sich für die bioaktiven Peptide pharmazeutische aber auch diätetische Anwendungsmöglichkeiten als funktionelle Nahrungsmittel bzw. Nutraceuticals zur Minimierung von Krankheitsrisiken oder zur Verbesserung bestimmter physiologischer Funktionen (Meisel & FitzGerald, 2003).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, MIPs zu synthetisieren, die gegenüber den vorher genannten Zielmolekülen eine hohe Affinität aufweisen, so dass basierend auf diesen eine leistungsfähige Methode zur Probenaufbereitung und Analytenkonzentrierung erarbeitet werden kann. Hierbei ist die künftige Anwendung der MIPs für die Festphasenextraktion zur selektiven Anreicherung eines Analyten, insbesondere in Kombination mit einer Matrix-sensitiven instrumentellen Analytik von Interesse. Die Entwicklung von selektiven und reproduzierbaren Methoden zur Quantifizierung bestimmter Lebensmittelinhaltsstoffe, wie beispielsweise Chloramphenicol oder Nisin, ist für die Kontrolle und Sicherung der Qualität der Lebensmittel von großer Wichtigkeit. Im Fall der bioaktiven Peptide kann durch deren Anreicherung eine ernährungsphysiologische Wertsteigerung der Lebensmittel erreicht werden. Zur Synthese der Polymere wurde unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Zielmoleküle die Methode der Bulk-Polymerisation sowie die Methode der hierarchischen Prägung angewendet.

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1. Molekular geprägte Polymere

#### 2.1.1. Molekularer Prägnungsprozess

Beim molekularen Prägnungsprozess wird ein Templatmolekül mit einem funktionellen Monomer oder einer Kombination aus mehreren funktionellen Monomeren vermischt (Abb. 2-1). Das funktionelle Monomer ordnet sich räumlich um das Templat an und bildet über nicht kovalente oder kovalente Wechselwirkungen einen stabilen Komplex mit dem Templat aus (Wulff, 1995; Kempe & Mosbach, 1995; Mosbach & Ramström, 1996; Andersson, 2000b). Die Position des funktionellen Monomers wird durch Copolymerisation mit einem Quervernetzer fixiert, wobei ein festes und hochvernetztes Polymer um das Templat herum entsteht. Nach Beendigung der Polymerisation wird das Templat aus der Polymermatrix entfernt, so dass Bindungsstellen zurückbleiben, die in ihrer Größe, Form und sterischen Ausrichtung der funktionellen Gruppen komplementär zu dem geprägten Molekül sind. Diese Bindungsstellen sind für die selektive Wiedererkennung des Zielanalyten verantwortlich.

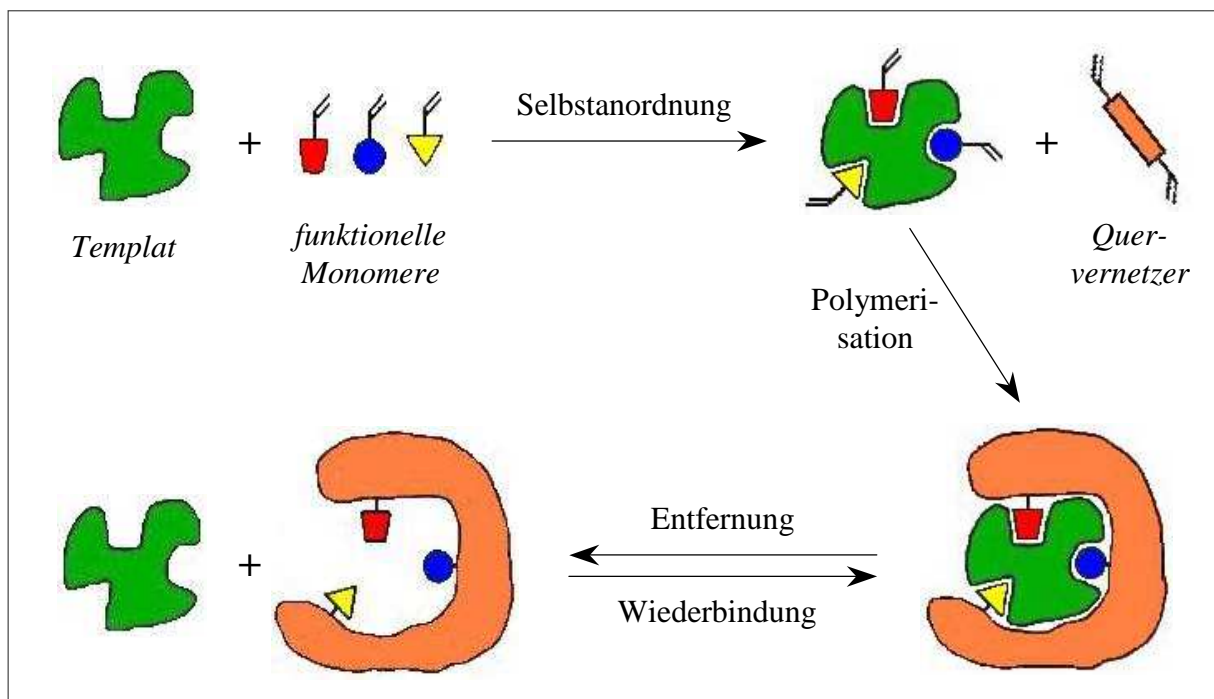


Abb. 2-1: Schematische Darstellung des molekularen Prägnungsprozesses (in Anlehnung an Wulff, 1995)

### **2.1.1.1. Nicht kovalente Prägung**

Das Templat reagiert mit dem funktionellen Monomer während der nicht kovalenten Prägung sowie während der selektiven Wiedererkennung über nicht kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen (Wulff, 1995; Kempe & Mosbach, 1995; Mosbach & Ramström, 1996; Andersson, 2000b). Auf Grund der Flexibilität ist die nicht kovalente Prägung die verbreitetste Methode zur Synthese von MIPs, so dass in der Literatur eine Vielzahl an Beispielen existiert. Die Bindungsstellen sind allerdings undefinierter und heterogener im Vergleich zu denen, die mittels kovalenter Prägung (Abschnitt 2.1.1.2.) synthetisiert werden.

### **2.1.1.2. Kovalente Prägung**

Während der kovalenten Prägung wird das Templat über reversible kovalente Bindungen an das funktionelle Monomer gebunden. Häufig genutzte Bindungstypen sind Ester von Carbonsäuren oder Borsäuren, Ketale oder Imine (Schiff'sche Base). Nach Beendigung der Polymerisation wird das Templat aus der Polymermatrix entfernt, indem die kovalente Bindung chemisch gespalten wird. Die zurückbleibenden Bindungstaschen sind definierter und homogener als die Bindungsstellen, die durch nicht kovalente Prägung entstehen (Wulff, 1995; Kempe & Mosbach, 1995; Mosbach & Ramström, 1996; Andersson, 2000b). Da aber nur Template verwendet werden können, die eine heteroatomare Funktionalität besitzen, sind nur wenige Beispiele für die kovalente Prägung in der Literatur zu finden (Khasawneh et al., 2001).

### **2.1.1.3. Polymerisation**

Zur Synthese von MIPs wird überwiegend eine freie radikalische Polymerisation verwendet, da diese unter milden Reaktionsbedingungen durchgeführt werden kann und die gebildeten freien Radikale den Templat/Monomer-Komplex nicht stören (Sellergren, 2001; Ye & Mosbach, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Gelöster Sauerstoff sollte jedoch vor der Polymerisation aus dem Präpolymer durch z.B. Ultraschall und Einleitung eines inerten Gases entfernt werden (Lanza et al., 2001). Eine unzureichende Sauerstoffentfernung führt zu

einem höheren Anteil an nicht reagierten Monomeren im resultierenden Polymer. Die Initiation der Polymerisation erfolgt durch photochemische oder thermochemische Homolyse des Initiators.

Die Temperatur während der Polymerisation hat Einfluss auf den Polymerisationsprozess, auf die Polymermorphologie sowie auf den Templat/Monomer-Komplex (Lu et al., 2004). Daher ist die Polymerisationstemperatur hinsichtlich der Leistungsfähigkeit des synthetisierten Materials von Bedeutung. Eine niedrigere Polymerisationstemperatur ist für die Stabilität des Templat/Monomer-Komplexes im Präpolymer von Vorteil. Dagegen ist eine höhere Polymerisationstemperatur für die Vollständigkeit der Polymerisationsreaktion günstig. Somit stellt die Wahl der Polymerisationstemperatur einen Kompromiss zwischen der Stabilität des Templat/Monomer-Komplexes und der Vollständigkeit der Polymerisation dar. Weiterhin ist die Stabilität des Templats unter erhöhten Temperaturen zu beachten, da beispielsweise die native dreidimensionale Struktur von Peptiden oder Proteinen mit ansteigender Temperatur zerstört werden kann.

### **2.1.2. Bestandteile des Präpolymers**

#### **2.1.2.1. Templat**

Das Templatmolekül muss in seiner Struktur chemische Gruppen enthalten, die mit dem funktionellen Monomer Wechselwirkungen eingehen können, um einen ausreichend stabilen Templat/Monomer-Komplex auszubilden (Sellergren, 1999; Martin-Esteban, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Weiterhin muss das Templat in präparativer Menge verfügbar, in dem Monomergemisch löslich sowie unter den Polymerisationsbedingungen stabil und nicht reaktiv sein. Die Größe und Form des Templats aber auch des Zielanalyten haben ebenfalls Einfluss auf die Selektivität des resultierenden Polymers. Beispielsweise können Makromoleküle, wie Peptide oder Proteine, nicht durch die hochvernetzte Polymermatrix diffundieren und somit nicht die Bindungskavitäten erreichen (Ye & Mosbach, 2001). Das optimale Verhältnis vom Templat zum funktionellen Monomer wird mit 1:4 bis 1:18 angenommen. Es sind aber auch Empfehlungen zu finden, wo die Templatmenge 5% der gesamten Monomermenge entspricht (Sellergren, 1999). Unter Verwendung von

Quervernetzern, die mehr als zwei Vinylgruppen enthalten, kann die Templatmenge mehr als 5% der gesamten Monomermenge ausmachen, da hier eine höhere Menge an funktionellem Monomer eingesetzt wird. Die Untersuchungen von Yilmaz et al. (1999) zeigen, dass Polymere, die mit einem Templat/funktionellen Monomer-Verhältnis von 1:500 synthetisiert wurden, eine signifikant höhere Affinität zum Zielanalyten aufwiesen als die nicht geprägten Polymere. Wird das Templat im Überschuss zugesetzt, führt das nicht zu weiteren Bindungsstellen, wenn alle funktionellen Monomere bereits komplexiert sind (Spivak, 2005).

### 2.1.2.2. Funktionelles Monomer

Das funktionelle Monomer enthält mindestens zwei funktionelle Gruppen, wobei eine mit dem Templat über nicht kovalente Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen reagiert und eine andere kovalent mit dem Quervernetzer polymerisiert (Sellergren, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Die Kombination von zwei oder mehreren funktionellen Monomeren führte in einigen Fällen im Vergleich zu Polymeren, bei denen zur Synthese nur ein funktionelles Monomer verwendet wurde, zu höheren Wiedererkennungseigenschaften. Die Funktionalitäten des funktionellen Monomers sollten komplementär zu den Funktionalitäten des Templates sein, um die Wechselwirkungen im Präpolymer, aber auch in den geprägten Kavitäten des resultierenden Polymers, zu maximieren. Daher sind für Template, die saure Gruppen enthalten, basische funktionelle Monomere, wie 2-VPy oder DEAEMA, geeignet (Sellergren, 2001; Lanza & Sellergren, 2004). Saure funktionelle Monomere, wie MAA, sind bei Templates, die basische Gruppen enthalten, einzusetzen. Häufig verwendete funktionelle Monomere sind in der Abb. 2-2 dargestellt, wobei die MAA das verbreitetste funktionelle Monomer ist. Die breite Anwendbarkeit der MAA basiert darauf, dass die Carboxylgruppe bei Wasserstoffbrückenbindungen Akzeptor sowie Donator sein kann. Außerdem kann die MAA ionische Wechselwirkungen eingehen (Kempe & Mosbach, 1995; Ye & Mosbach, 2001). Die funktionellen Monomere 2 und 4VPy sind für Template, die beispielsweise Carboxylgruppen enthalten, verwendbar (Martin-Esteban, 2001; Sellergren, 2001). Diese reagieren mit dem Templat über Wasserstoffbrückenbindungen und/oder ionischen Wechselwirkungen.

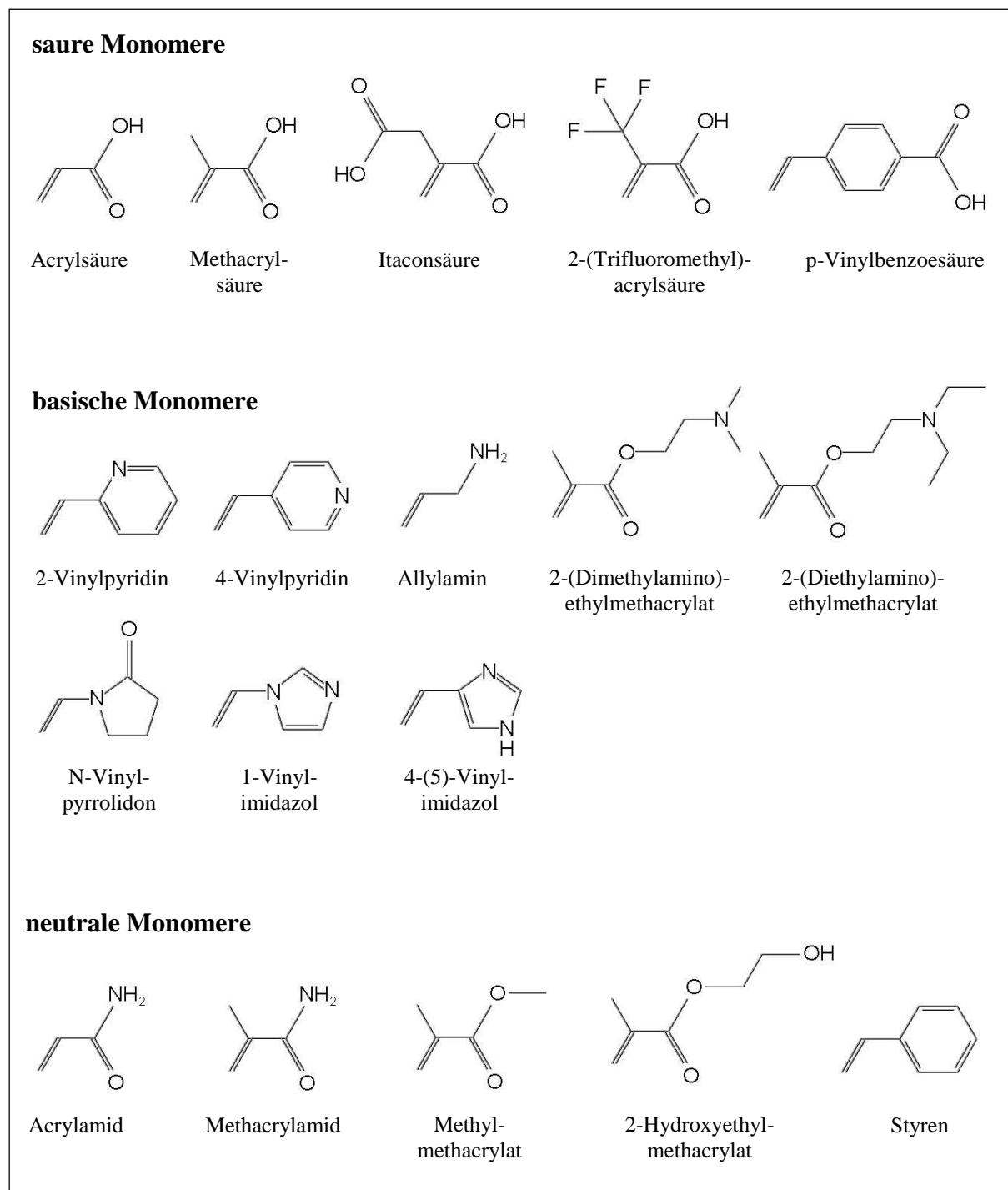


Abb. 2-2: Zur MIP-Synthese häufig verwendete funktionelle Monomere (Cormack & Elorza, 2004)

Ein Überschuss an funktionellen Monomeren führt zur Erhöhung des Anteils an nicht selektiven Bindungsstellen, was die Selektivität des MIPs verringert (Martin-Esteban, 2001; Spivak, 2005). Dagegen bewirken zu geringe Mengen an funktionellem Monomer eine Verringerung der Kapazität, da die funktionellen Monomere nicht ausreichend zur Verfügung stehen, um mit dem Templat in Wechselwirkung treten zu können.

### 2.1.2.3. Quervernetzer

In einem molekular geprägten Polymer hat der Quervernetzer drei Hauptfunktionen (Martin-Esteban, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Er kontrolliert die Morphologie der Polymermatrix, stabilisiert die molekular geprägten Bindungsstellen und verleiht dem Polymer mechanische Stabilität. Somit hat der Quervernetzer einen direkten Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Polymers. Ein optimaler Quervernetzeranteil an der gesamten Monomermenge liegt zwischen 50% und 80% (Spivak, 2005). Bei nicht kovalenten und auf Methacrylaten basierenden Polymeren ist EDMA der am häufigsten verwendete Quervernetzer (Abb. 2-3) (Martin-Esteban, 2001; Lanza & Sellergren, 2004). EDMA bedingt mechanische und thermische Stabilität, eine gute Benetzbarkeit in einer Vielzahl von Lösemitteln, einen schnellen Massentransfer sowie eine gute Selektivität. Beträgt der Anteil des EDMAs jedoch weniger als 50%, führt dies zu verminderten Wiedererkennungseigenschaften (Sellergren, 2001). Des Weiteren finden Quervernetzer mit drei oder vier Vinylgruppen, wie beispielsweise TRIM oder Pentaerythritoltetraacrylat, Anwendung (Abb. 2-3). Peptid geprägte Polymere, die mit TRIM synthetisiert wurden, zeigten oft eine höhere Probenladungskapazität und bessere Leistungsfähigkeit als Polymere, die mit EDMA synthetisiert wurden (Kempe, 1996; Lanza & Sellergren, 2004). Wird TRIM als Quervernetzer verwendet, wird eine größere Menge funktionelles Monomer eingesetzt als es bei Polymeren mit EDMA als Quervernetzer, da das TRIM im Gegensatz zum EDMA drei Vinylgruppen besitzt (Sellergren, 2001).



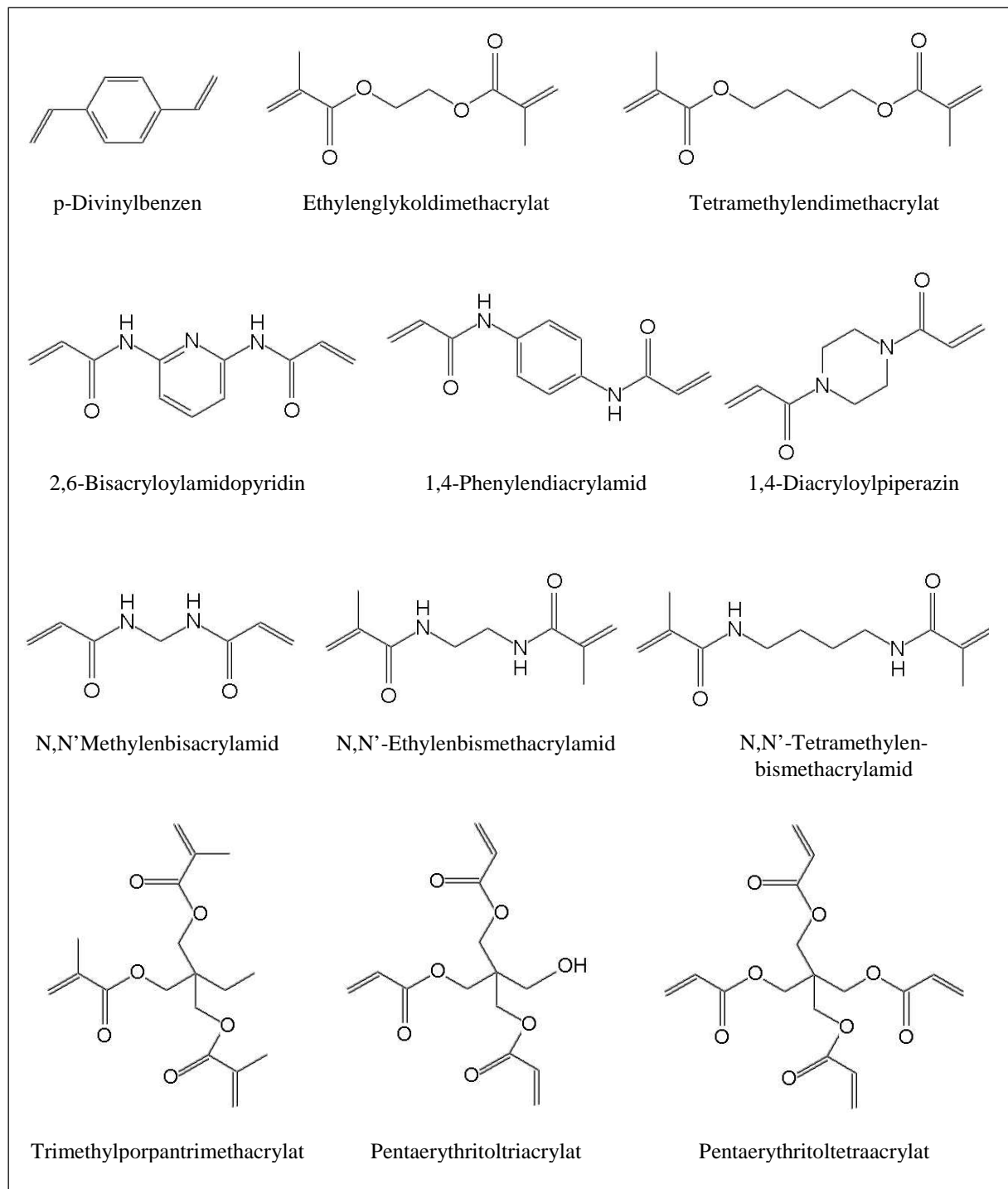


Abb. 2-3: Zur MIP-Synthese häufig verwendete Quervernetzer (Cormack & Elorza, 2004)

### 2.1.2.4. Initiator

Zur Initiation der freien radikalischen Polymerisation werden überwiegend Azoinitiatoren verwendet, da die entstehenden Radikale nur eine geringe Reaktivität gegenüber

Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen (Selligren, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Dagegen zeigen die Radikale die aus Peroxidinitiatoren entstehen, eine höhere Reaktivität gegenüber Wasserstoffbrückenbindungen. Im Vergleich zu den Monomeren wird der Initiator nur in geringer Konzentration zum Präpolymer zugesetzt und entspricht oft 1% bezogen auf das Gewicht oder die Molmasse der gesamten Monomermenge. AIBN ist ein häufig verwendeter Azoinitiator, der durch photochemische Homolyse unterhalb Raumtemperatur oder durch thermochemische Homolyse bei 60°C das Kettenwachstum initiiert. Die Halbwertszeit von AIBN beträgt bei 65°C 10 Stunden. Werden Azoinitiatoren wie 2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) oder 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) verwendet, kann die Polymerisation bei geringeren Temperaturen durchgeführt werden, da deren Halbwertszeit von 10 h bei einer Temperatur von 30°C bzw. 51°C erreicht wird (Produktinformation Wako Chemicals GmbH).

### 2.1.2.5. Porogen

Im Porogen werden alle Bestandteile des Präpolymers vereint, so dass diese im Porogen vollständig löslich sein müssen (Selligren, 1999). Durch die chemischen Eigenschaften und das Volumen des Porogens kann die Polymermorphologie bezogen auf die spezifische Oberfläche und den Porendurchmesser kontrolliert werden. Da ein zunehmendes Porogenvolumen zu einem größeren Porenvolumen führt, ist es üblich, das Lösemittel im Präpolymer als Porogen zu bezeichnen. Das Volumen des Porogens sollte geringfügig höher als das Monomervolumen sein, um ein poröses Polymer zu erhalten. Ursachen für schlechte Wiedererkennungseigenschaften können eine geringe Oberfläche und Porosität und eine daraus resultierende langsame Analytendiffusion zu den Bindungsstellen sein (Martin-Esteban, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Die Wiedererkennungseigenschaften eines MIPs sind jedoch nicht unbedingt von der Porosität abhängig, da unter Verwendung von Chloroform als Porogen, das Materialien mit geringer Porosität und Oberfläche ergibt, gute Ergebnisse erzielt werden können (Spivak, 2005). Polymere, die ohne Porogen synthetisiert werden, weisen keine Selektivität auf, da die Analyten nicht in das Polymer eintreten können. Weiterhin hat das Porogen einen direkten Einfluss auf die Stärke der Wechselwirkungen zwischen dem Templat und dem funktionellen Monomer, die hinsichtlich einer erfolgreichen Prägung maximal sein sollten (Martin-Esteban, 2001; Cormack & Elorza, 2004; Lanza & Selligren, 2004). Basieren die Templat/Monomer-Wechselwirkungen auf polaren Kräften,

wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen, sollte ein Lösemittel, das eine geringe Polarität hat, ausgewählt werden, damit es so wenig wie möglich mit den Monomeren um das Templat konkurriert. Werden dagegen hydrophobe Kräfte zur Templat/Monomer-Komplexbildung genutzt, kann beispielsweise Wasser oder Methanol als Lösemittel dienen.

### 2.1.3. Eigenschaften der MIPs

#### 2.1.3.1. Morphologie

Die Grundlage der Polymermorphologie ist der Nukleus, der sich um einen Initiator bildet und auf einen Durchmesser von 10 nm bis 30 nm anwächst (Abb. 2-4) (Sellergren, 1999; Spivak, 2005). Die Nuklei aggregieren zu Mikrosphären. Die Mikrosphären, die einen Durchmesser von 100 nm bis 200 nm haben und mit Mikroporen ( $< 2$  nm) durchzogen sind, lagern sich zu Aggregaten zusammen, die einen Durchmesser im Mikrometerbereich haben und Mesoporen (2 – 50 nm) sowie Makroporen (50 – 1000 nm) beinhalten. Die Aggregate der Mikrosphären ergeben Cluster, die den Polymerpartikel bilden. Somit wird die Porosität und die daraus resultierende Oberfläche des Polymers von den Mikro-, Meso- und Makroporen bestimmt, wobei die Mikroporen die Polymeroberfläche deutlich mehr vergrößern als die Makroporen. Typische Werte für Oberflächen von MIPs liegen in einem Bereich zwischen  $100 \text{ m}^2/\text{g}$  und  $400 \text{ m}^2/\text{g}$ .

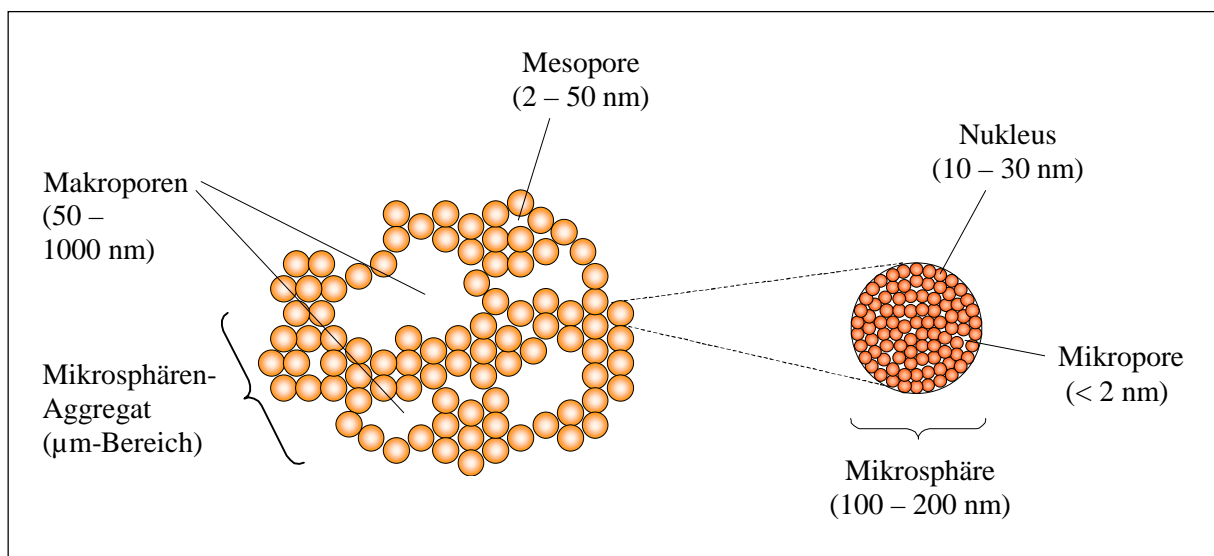


Abb. 2-4: Modell der Morphologie eines porösen Polymernetzwerkes (Spivak, 2005)

## 2. Theoretischer Hintergrund

Die Tabelle 2-1 zeigt in Abhängigkeit vom Porogen ermittelte Oberflächen, Porenvolumina und Porengrößen von verschiedenen Polymeren.

Tab. 2-1: Oberfläche, Porenvolumen und durchschnittliche Porengröße von MIPs in Abhängigkeit vom verwendeten Porogen (Selligren & Shea, 1993)\*

Porogen	Oberfläche (m <sup>2</sup> /g)	Porenvolumen (ml/g)	durschnittl. Porengröße (nm)
Acetonitril	256	0,60	9,4
Chloroform	3,5	0,007	9,1
Methylenchlorid	3,8	0,007	7,1
Dimethylformamid	127	0,17	5,2
Benzen	216	0,43	7,8

\*Bulk-Polymerisation; 20 mmol EDMA; 4 mmol MAA; 1 mmol L-Phenylalanin-Anilid; 0,25 mmol AIBN; 5,6 ml Porogen; Polymerisation für 24 h bei 15°C durch photochemische Initiation

### 2.1.3.2. Vor- und Nachteile

Der Wiedererkennungsprozess von MIPs ist dem von Makrobiomolekülen, wie Enzymen oder Antikörpern, ähnlich. Die MIPs haben jedoch gegenüber den Biomolekülen, wie in der Tabelle 2-2 gezeigt, deutliche Vorteile. Biologische Wiedererkennungssysteme, wie Antikörper, Enzyme, pflanzliches bzw. tierisches Gewebe oder Zellen, sind hochselektiv gegenüber dem Zielanalyten. Die Biomoleküle sind jedoch empfindlich, nicht sehr stabil sowie schlecht lagerbar. Außerdem ist deren Herstellung und Aufreinigung oft langwierig, teuer und bedarf, wie im Fall von Antikörpern, des Einsatzes von Versuchstieren.

Tab. 2-2: Vor- und Nachteile von MIPs (Mosbach & Ramström, 1996; Mahony et al., 2005)

Vorteile	Nachteile
vorbestimmte Selektivität	präparative Templatmenge erforderlich
hohe chemische und physikalische Stabilität	Ausblutung des Templats
kosteneffektiv	neigen zum Schrumpfen oder Quellen
einfache Herstellung	heterogene Bindungsstellen
in verschiedenen Formaten synthetisierbar (Partikel, Block, Dünnschicht)	geringe Probenladungskapazität
lagerbar über Jahre	langsamer Massentransfer

Svenson und Nicholls (2001) untersuchten den Einfluss erhöhter Temperaturen auf MAA-basierende Polymere. Dabei stellten sie fest, dass eine 24stündige Exposition bei Temperaturen bis 150°C keinen Affinitätsverlust gegenüber dem Templat bewirkte. Waren die Polymere Temperaturen über 150°C ausgesetzt, wurde ein Verlust an Affinität zum Templat, Bindungskapazität und Masse beobachtet, wobei die Verluste, in Folge von temperaturabhängigen Decarboxylierungen, auf Veränderungen der Polymerkonformation beruhten. Ein Hauptproblem der MIPs besteht darin, dass Templatreste auch nach sorgfältigem Waschen mit einem geeigneten Lösemittel in der Polymermatrix zurückbleiben. Diese Templatreste, die jedoch für gewöhnlich weniger als 1% der zur Polymersynthese eingesetzten Templatmenge entsprechen, bluten insbesondere nach Lösemittelwechsel aus (Sellergren, 1999; Lanza & Sellergren, 2001). Entspricht der Zielanalyt dem Templat, kann das Ausbluten des Templats die Quantifizierung beeinträchtigen. Deshalb wird als Templat oft eine zum Zielanalyten strukturähnliche Verbindung verwendet, so dass die Templatblutungen die Quantifizierung nicht stören (Wulff, 1995). Ein anderer in der Literatur dargestellter Lösungsansatz beinhaltet die nachträgliche Erhitzung der Polymere (Zander et al., 1998). Des Weiteren neigen MIPs bei Lösemittelwechsel zur Schrumpfung oder Quellung, was eine Deformation der Prägungskavitäten und damit einen Verlust an Selektivität verursachen kann (Remcho & Tan, 1999; Sellergren, 2001; Turner et al., 2004). Der begrenzte Massentransfer führt bei chromatographischen Anwendungen zu breiten Peaks sowie Peakasymmetrien (Sellergren & Shea, 1995; Sajonz et al., 1998). Dies beruht auf langsamer Diffusion durch das Polymernetzwerk oder auf langsamen Wechselwirkungen an den Bindungsstellen. Weitere Ursachen für die geringe chromatographische Effizienz stellt die Heterogenität der Bindungsstellen dar, die das Ergebnis von unvollständigen Templat/Monomer-Verbindungen ist, sowie die amorphe Natur der Polymermatrix.

### **2.1.4. Wiedererkennung des Templats**

#### **2.1.4.1. Bindungsstellen**

Für die selektive molekulare Wiedererkennungseigenschaft ist die Bindung des Templats an die präorganisierten funktionellen Gruppen, die das Templat energetisch bevorzugen, aber auch die Form- und Größenselektivität der Bindungskavität, die komplementär zum Templat

ist, entscheidend (Martin-Esteban et al., 2001; Spivak et al., 2004). Die Polymermatrix ist neben der Stabilisierung der Bindungsstellen auch für die Zugänglichkeit der Bindungsstellen, die durch die Porosität vorgegeben ist, verantwortlich. Basierend auf den Kriterien Zugänglichkeit, Vollständigkeit und Stabilität können die Bindungsstellen in verschiedene Typen klassifiziert werden, die in der Abbildung 2-5 graphisch dargestellt sind.

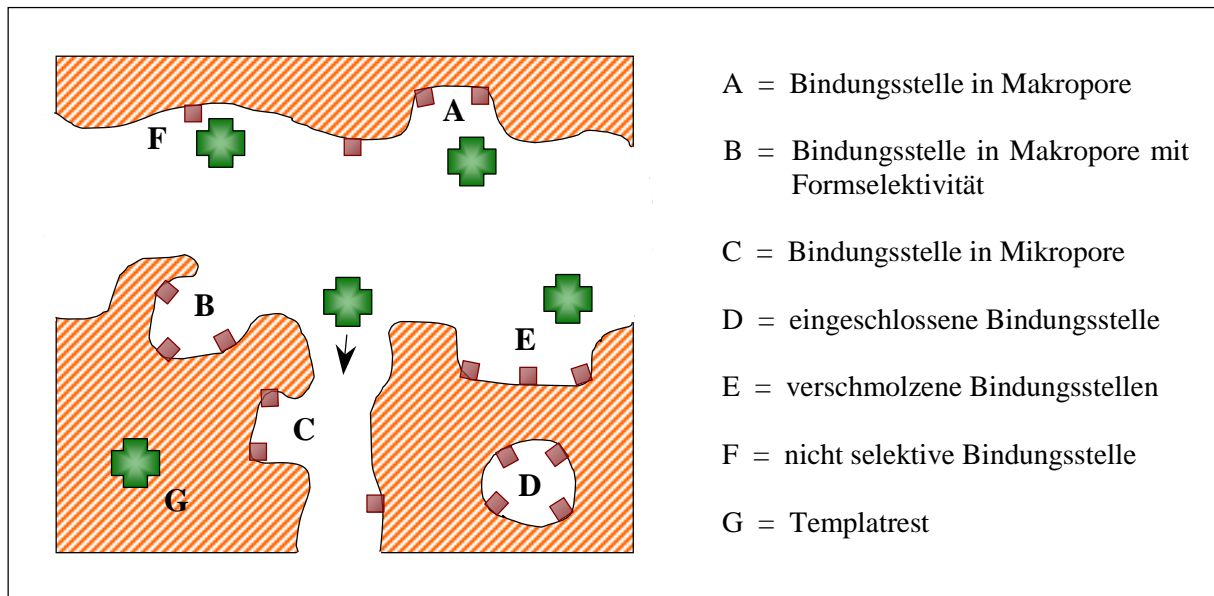


Abb. 2-5: Verschiedene Bindungsstellentypen in MIPs (Sellergren, 1999)

Die Bindungsstellen in den Makro- und Mesoporen sind leicht zugänglich, so dass ein schneller Massentransfer möglich ist (Andersson et al., 1999; Sellergren, 1999; Nicholls et al., 2001; Szabelski et al., 2002). Dagegen sind die Bindungsstellen, die in den Mikroporen lokalisiert sind, schwieriger zu erreichen, so dass die Diffusion und somit der Massentransfer langsamer verläuft. Die Oberfläche der Mikroporen ist bei einem gegebenen Porenvolumen größer als das der Makro- und Mesoporen. Folglich ist die überwiegende Anzahl der Bindungsstellen in den Mikroporen zu finden. Im Idealfall ergibt jeder Templat/Monomer-Komplex eine Bindungskavität während der Polymerisation. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass neben dem Templat auch Cluster, bestehend aus mehreren Templaten, in die Polymermatrix geprägt werden. Dies führt zu unvollständigen Bindungsstellen auf Grund der Vereinigung von zwei oder mehreren Bindungsstellen. Weiterhin verbleiben einzelne Templatrete in der Polymerstruktur zurück und geben somit die Kavität nicht frei. Je größer die Kontaktfläche zwischen Templat und Kavität auf Grund derer Größe und Form ist, desto höher ist die definierte Selektivität (Spivak et al., 2004). Daher wurden beispielsweise auf einem mit Nortriptylin (Antidepressivum) geprägten Polymer für die Verbindungen, die in

ihrer Molekülstruktur dem Templat ähnlich waren, höhere Prägungseffekte erreicht als für die meisten Moleküle, die eine nicht dem Templat ähnliche Molekülstruktur aufwiesen (Vallano, 2000; Khasawneh et al., 2001). Dies weist darauf hin, dass der Quervernetzer ebenfalls einen aktiven Teil der Prägung übernimmt und nicht nur als Gerüstmaterial für die funktionellen Monomere dient (Spivak et al., 2004).

### **2.1.4.2. Mediumabhängige Wiederbindung des Templats**

Die Retention des Zielanalyten auf einem entsprechenden MIP stellt die Summe aus selektiver Bindung an die Prägungskavität und nicht selektiver Bindung an die Polymermatrix dar, wobei die selektive Bindung des Analyten überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen und/oder ionischen Wechselwirkungen beruht. Die Selektivität sowie die Art der Wechselwirkungen werden stark von dem verwendeten Lösemittel, wie beispielsweise der mobilen Phase bei HPLC-Untersuchungen oder der Wasch- bzw. Elutionslösung während der Festphasenextraktion, beeinflusst (Yu & Mosbach, 2000; Martin-Esteban et al., 2001). Es wird diskutiert, dass es von Vorteil sein soll, wenn der Eluent identisch mit dem Porogen ist, das während der Polymerisation verwendet wurde, so dass bei der Wiedererkennung gleiche Bedingungen wie bei der Bildung der Bindungsstellen vorliegen (Kempe & Mosbach, 1995; Dauwe & Sellergren 1996).

In aprotischen, d.h. ohne funktionelle Gruppen, aus denen Wasserstoff-Ionen dissoziieren können, und gering polaren organischen Lösemitteln sind für die Selektivität überwiegend polare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen und/oder ionische Wechselwirkungen, verantwortlich (Dauwe & Sellergren, 1996; Yu & Mosbach, 2000; Pap et al., 2002; Rosengren et al., 2005). Folglich kann eine Abnahme der Retention und Selektivität beobachtet werden, wenn der Wasser-Anteil zunimmt, da dieser die polaren Wechselwirkungen zwischen Templat und Polymer stört. Weiterhin nimmt die selektive Bindungsfähigkeit mit steigender Polarität des verwendeten Lösemittels ab, so dass mit Lösemittelmischungen oder Lösemitteln, die eine mittlere Polarität haben, die polaren, aber auch die hydrophoben Wechselwirkungen zu schwach sind, um eine ausreichend starke Bindung zu erreichen (Chianella et al., 2006).

In wässrigen Lösemittelmischungen basiert die Bindung überwiegend auf hydrophoben Wechselwirkungen, so dass mit ansteigendem Wasser-Anteil die Bindungsstärke zunimmt. Wasserstoffbrückenbindungen können im wässrigen Medium zwischen Templat und Polymer nicht ausgebildet werden, da Wasser mit dem Polymer um die Wasserstoffbindungsstellen konkurriert (Yu & Mosbach, 2000; Sellergren, 2001; Pap et al., 2002; Rosengren et al., 2005). Daher korreliert in wasserreichen mobilen Phasen die Affinität und Selektivität mit der Templathydrophobizität, so dass für hydrophobe Zielmoleküle selektive und nicht selektive hydrophobe Einflüsse bei der Bindung beobachtet werden können (Dauwe & Sellergren, 1996). Für hydrophile Template nimmt dagegen die Bindung und Selektivität mit ansteigendem Wasser-Anteil ab. Somit verhalten sich MIPs unter wässrigen Bedingungen, auf Grund der Adsorption an die hydrophobe Polymeroberfläche, wie Umkehrphasensysteme (Baggiani et al., 2001; Sellergren, 2001).

Des Weiteren können der pH-Wert oder die Ionenstärke Einfluss auf die Wiedererkennung haben. Beispielsweise nimmt die Retention und Selektivität in einem apolaren Lösemittel mit steigendem pH-Wert ab, da der zunehmende Ionisierungsgrad z.B. der Carboxylgruppen der Polymermatrix den Verlust an Donatorgruppen für die Wasserstoffbrückenbindungen zur Folge hat (Dauwe & Sellergren, 1996).

### **2.1.5. Mini-MIPs**

Für die Anwendung der MIP-Technologie ist es notwendig, diese an die jeweiligen Anforderungen anzupassen. Dabei liegt die Hauptaufgabe in der Identifikation und Optimierung der Faktoren, welche die Polymerstruktur sowie die Selektivität beeinflussen, wie beispielsweise Art und Konzentration des funktionellen Monomers, des Quervernetzers und des Porogens oder der Temperatur während der Polymerisation (Lanza & Sellergren, 1999; Lanza et al., 2001). Die Arbeitsgruppen um Takeuchi und um Sellergren entwickelten unabhängig voneinander eine kombinatorische automatisierbare Methode zur MIP-Optimierung, die es erlaubt, in kurzer Zeit eine große Anzahl an Bulk-Polymeren (siehe Abschnitt 2.1.6.1.) im Kleinmaßstab zu synthetisieren. Diese mini-MIPs, die ungefähr 50 mg



## 2. Theoretischer Hintergrund

Material bzw. 120 µl Präpolymer umfassen, polymerisieren auf dem Boden von kleinen Glasfläschchen oder auf dem Kavitätsboden einer Mikrotiterplatte (Abb. 2-6).

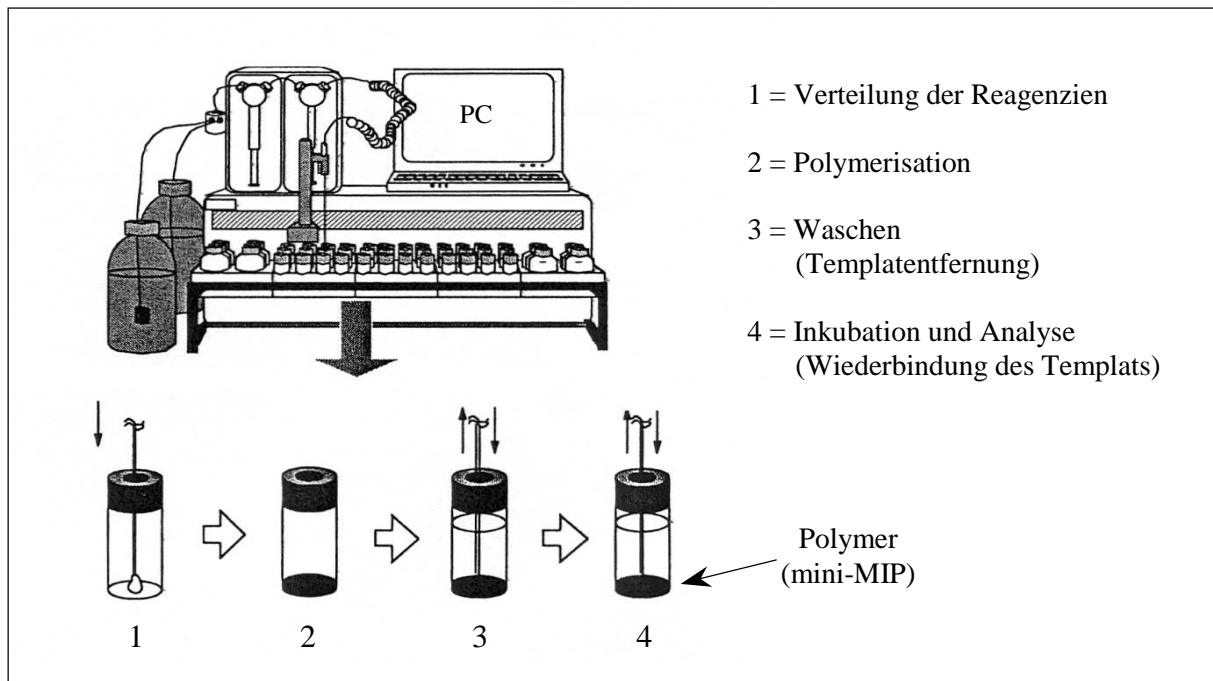


Abb. 2-6: Synthese und Evaluierung von mini-MIPs (Takeuchi et al., 2001a)

Takeuchi et al. (1999) synthetisierten eine Reihe von mini-MIPs, wobei die Bestandteile des Präpolymers mittels eines programmierbaren Flüssigkeitssteuerungsprogrammes in 1,5 ml Glasfläschchen, die mit einem Silicondeckel verschlossen waren, überführt wurden. Die Polymere waren mit den Triazin-Herbiziden Ametryn oder Atrazin geprägt und enthielten zur Optimierung der Leistungsfähigkeit verschiedene Verhältnisse der funktionellen Monomere Methacrylsäure oder Trifluoromethacrylsäure. Die synthetisierten MIPs, die sich an der Bodenfläche der Glasfläschchen befanden, wurden nach Entfernung des Templats evaluiert, indem die Desorption und Adsorption des Templats, das in Acetonitril gelöst war, untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die mit Trifluoromethacrylsäure synthetisierten Polymere die höchste Selektivität gegenüber Ametryn aufwiesen und die mit Methacrylsäure synthetisierten Polymere die höchste Selektivität gegenüber Atrazin zeigten. In weiteren Untersuchungen synthetisierten Takeuchi et al. (2001b) Cinchonidin (Alkaloid) geprägte Polymere, die verschiedene Mengen an funktionellem Monomer enthielten und sich in den Kavitäten einer 96-Well-Mikrotiterplatte befanden. Die Evaluierung der Polymere erfolgte hier mittels eines Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerätes, so dass das Templat fluoreszierend sein musste.

Die Arbeitsgruppe um Sellergren versuchte mittels der von ihnen ebenfalls entwickelten kombinatorischen Methode, die Wahl des funktionellen Monomers sowie einige Polymerisationsbedingungen, wie beispielsweise die Entgasungszeit oder die Initiation, zu optimieren (Lanza & Sellergren, 1999; Lanza et al., 2001; Lanza & Sellergren, 2004). Die Synthese sowie die Evaluierung der mini-MIPs erfolgte am Boden von HPLC-Autosamplergefäßen. Die Evaluierung der resultierenden Polymere, die der Erfassung der Kapazität der Bindungsaffinität und der Selektivität gegenüber dem Zielmolekül diene, beinhaltete unter anderem Wiederbindungsuntersuchungen. Diese erfolgten nach vollständiger Entfernung des Templats aus den Polymermatrices, indem auf die mini-MIPs das Templat gegeben wurde, das im porogenen oder einem anderen Lösemittel gelöst war. Im Überstand wurde dann in definierten Zeitintervallen die freie bzw. nicht gebundene Templatmenge mittels des analytischen Verfahrens HPLC-UV quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass meistens eine gute Korrelation zwischen der Selektivität im Kleinmaßstab- und Großmaßstabverfahren besteht. Allerdings wurden bei der Suche nach einem optimal geeigneten funktionellen Monomer für die Wiedererkennung der Template Phenytoin (Antiepileptikum) und Nifedipin (Antihypertonikum, Kalziumantagonist) Grenzen dieser Methode deutlich, da das Polymer, das im Kleinmaßstab gute Wiederbindungseigenschaften aufwies, im Großmaßstab keine gute Selektivität erzielte. Somit erlauben die Ergebnisse der Wiederbindungsuntersuchungen im Kleinmaßstab, die auf Gleichgewichtseinstellungen basieren, nicht immer korrekte Vorhersagen für die Selektivität des MIPs im Großmaßstab, wie beispielsweise der HPLC-Technik.

### **2.1.6. Methoden zur MIP-Synthese**

Geprägte Materialien mit einer homogenen Morphologie wurden nach Angaben in der Literatur mittels Fällungs-, Suspensions- oder Multi-Step-Swelling-Polymerisation hergestellt. Der Nachteil dieser Techniken liegt allerdings darin, dass die Morphologie der resultierenden Polymerpartikel sehr empfindlich auf geringe Veränderungen in den Synthesebedingungen reagiert (Titirici & Sellergren, 2004). Außerdem sind viele dieser Prozeduren durch die begrenzte Verwendbarkeit von verschiedenenartigen Monomeren oder Porogenen zur Polymerisation eingeschränkt.

Pérez-Moral und Mayes (2004) verglichen Propanolol geprägte Polymere, die mit verschiedenen Methoden synthetisiert wurden, um den Einfluss der Synthesemethode auf die Wiederbindungseigenschaften des resultierenden Polymers abschätzen zu können. Dafür wurden Polymere der gleichen Zusammensetzung mittels Bulk-, Fällungs-, Suspensions- (in Perfluorokohlenwasserstoff), Multi-Step-Swelling- und Core-Shell-Emulsions-Polymerisation synthetisiert. Anschließend wurde deren Fähigkeit, Propanolol zu binden, mittels Radioliganden-Bindungsuntersuchungen ermittelt. Dabei herrschten identische analytische Bedingungen. Unter Verwendung eines organischen Lösemittels (Toluol + 0,5% Essigsäure) wurden folgende Wiederbindungen erreicht: Fällung (50%) > Suspension (40%) > Bulk (35%) > Core-Shell (15%) > Multi-Step-Swelling (10%). Dagegen wurden unter Verwendung eines wässrigen Lösemittels (Natriumcitrat 25 mmol + 0,5% Essigsäure + 2% Ethanol, pH 4,6) folgende Wiederbindungen erzielt: Multi-Step-Swelling (20%)  $\cong$  Suspension (19%)  $\cong$  Bulk (19%) > Core-Shell (15%) > Fällung (0%).

### 2.1.6.1. Bulk-Polymerisation

Auf Grund der Einfachheit sowie universellen Anwendbarkeit ist die Bulk-Polymerisation (Abb. 2-7) die am häufigsten verwendete Methode. Diese ist bei der kovalenten und nicht kovalenten Polymerisation einsetzbar und benötigt zudem keine Zusätze an Stabilisatoren oder oberflächenaktiven Substanzen. Das Präpolymer, bestehend aus Templat, funktionellem Monomer, Quervernetzer, Initiator und Porogen, polymerisiert zu einem festen Polymerblock. Dieser wird mechanisch gemahlen und anschließend gesiebt. Das Mahlen und Sieben, das sehr zeitaufwendig ist, verursacht jedoch einen Polymerverlust zwischen 40% und 60% (Andersson, 2000a; Martin-Esteban, 2001; Pérez-Moral & Mayes, 2004). Während des Mahlens wird außerdem ein Teil der Bindungsstellen geschädigt oder sogar zerstört. Dies führt zu einem Verlust an Ladungskapazität bezogen auf die theoretische Ladungskapazität, die anhand der eingesetzten Templatmenge abgeschätzt werden kann. Die resultierenden Polymerpartikel sind von unregelmäßiger Größe und Form, was für eine chromatographische Anwendung nicht ideal ist. Weiterhin können unregelmäßig geformte Partikel Ursache für einen zunehmenden Druck, beispielsweise während einer Festphasenextraktion, sein, so dass die SPE-Kartuschen nach längerer Verwendung blockieren (Hu et al., 2005).

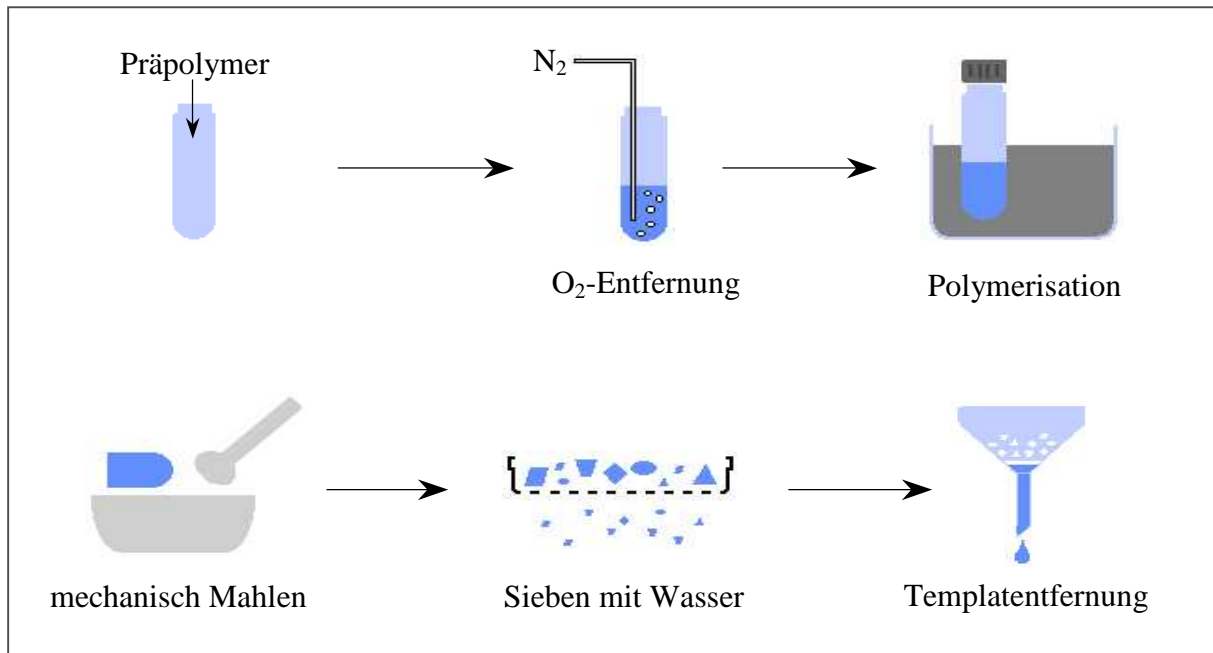


Abb. 2-7: MIP-Synthese mittels der Bulk-Polymerisation

### 2.1.6.2. Polymerisation in vorgeformten Partikeln

#### 2.1.6.2.1. Prägung in vorgeformten Partikeln

Die Polymerisation erfolgt innerhalb der Poren vorgeformter Partikel, wobei die Poren als Mikrogefäße, in denen eine konventionelle Bulk-Polymerisation durchgeführt wird, dienen (Yilmaz et al., 2002). Dafür werden die Poren mit dem Präpolymer unter Anwendung eines milden Vakuums, von Ultraschall oder Rühren mit einem Spatel befüllt. Nach Beendigung der thermisch initiierten Polymerisation werden die vorgeformten Partikel aus dem Gemisch herausgelöst. Die resultierenden Polymerpartikel zeigen folglich die gleiche Größe und Form wie das formgebende Material. Bei den vorgeformten Partikeln handelt es sich überwiegend um Silicagelpartikel, da diese in einer Vielzahl an Größen und Porositäten kommerziell erhältlich sind. Die mit dieser Technik hergestellten Polymere weisen einen geringeren Gegendruck bei der Elution sowie einen höheren Massentransfer auf. Die Problematik der eingeschränkten chromatographischen Effizienz auf Grund von asymmetrischen Peaks ist aber auch bei diesen Materialien vorhanden.

### 2.1.6.2.2. Hierarchische Prägung

Bei der hierarchischen Prägung (Abb. 2-8) erfolgt die Polymerisation ebenfalls innerhalb der Poren poröser Silicagelpartikel. Dabei ist allerdings das Templat an die Silicageloberfläche immobilisiert und nicht, wie im vorherigen Abschnitt 2.1.6.2.1. dargestellt, im Präpolymer gelöst (Yilmaz et al., 2000; Titirici et al., 2002; Titirici et al., 2003; Titirici & Sellergren, 2004). Die Immobilisation, beispielsweise einer Peptidsequenz, erfolgt mittels einer Standardfestphasensynthese, wie der Fmoc-Strategie ( $\alpha$ -Aminoschutzgruppe). Nach Immobilisation des Templats an die Silicageloberfläche werden die Poren des Silicagels mit dem Präpolymer, das in diesem Fall nur aus funktionellem Monomer, Quervernetzer und Initiator besteht, durch wiederholte Vakuum-Stickstoff-Zyklen befüllt. Nach Beendigung der thermisch initiierten Polymerisation wird das Silicagel aus dem resultierenden Silicagel/Polymer-Gemisch mit einer Ammoniumhydrogendifluorid-Lösung entfernt. Die zurückbleibenden Polymerpartikel sind somit ein Abdruck der ursprünglichen Silicagelpartikel. Da die molekular geprägten Bindungsstellen auf der Oberfläche der Polymerpartikel lokalisiert sind, können diese als Wiedererkennungselemente für biologische Makromoleküle, wie beispielsweise Peptide, Proteine oder Nukleotide, eingesetzt werden. Somit übersteigen die Retentions- und Prägungsfaktoren, die mit den hierarchisch geprägten Polymeren erzielt werden, die Werte der konventionellen Bulk-Polymere (Titirici et al., 2003).

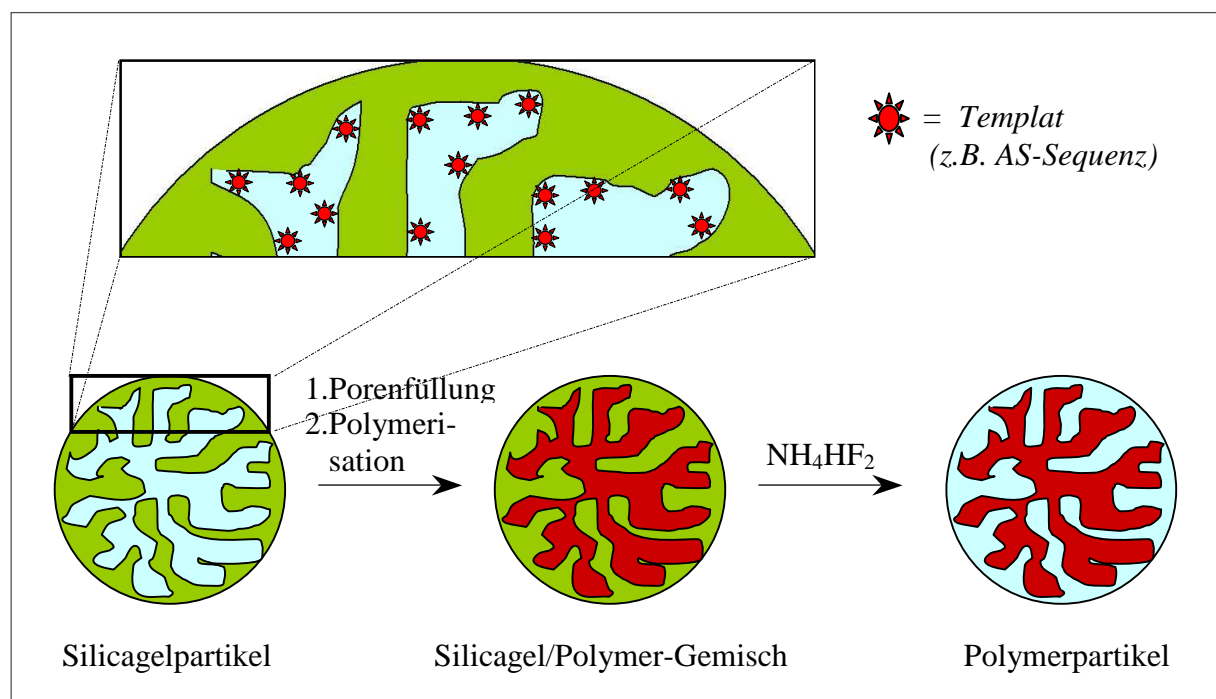


Abb. 2-8: MIP-Synthese mittels hierarchischer Prägung (Titirici & Sellergren, 2004)

### 2.1.6.3. Polymer-Monolith

Zur Vereinfachung der Polymersynthese entwickelten Matsui et al. (1993) eine in-situ-Polymerisationstechnik, bei der eine Säule mit dem Präpolymer befüllt wird und in dieser auspolymerisiert (Matsui et al., 1993; Matsui & Takeuchi, 1997). Da der resultierende MIP-Monolith in der Säule als stationäre Phase dient, muss das Porogen sorgfältig gewählt werden, um eine ausreichende Porosität und somit eine gute Flussrate zu gewährleisten. Mit diesem Verfahren konnte eine gute Separation erzielt werden. Da aber die Porengröße schlecht zu kontrollieren ist, konnte die Peaksymmetrie nicht verbessert werden.

### 2.1.6.4. Fällungs-Polymerisation

Die Fällungs-Polymerisation ist eine einfach durchzuführende und wenig zeitaufwendige Methode, die für kovalente und nicht kovalente Verfahren verwendbar ist und zudem keiner Zusätze an Stabilisatoren oder oberflächenaktiver Substanzen bedarf. Diese Methode basiert darauf, dass das Präpolymer, bestehend aus Templat, funktionellem Monomer, Quervernetzer und Initiator, in einem höheren Porogenvolumen, als es bei einer Bulk-Polymerisation der Fall ist, polymerisiert (Ye et al., 1999a; Ye & Mosbach, 2001). Auf Grund des verdünnten Reaktionssystems sind die wachsenden Polymerketten nicht in der Lage, das gesamte Volumen des Reaktionsraumes einzunehmen, so dass die Polymerpartikel im Lösemittel ausfallen. Die resultierenden monodispersen und mikrosphärischen Polymerpartikel können in geeigneten Lösungsmitteln leicht suspendiert werden, wobei sie nicht zur Fällung oder Aggregation neigen. Allerdings haben die Fällungs-Partikel nur einen Durchmesser von ungefähr 1  $\mu\text{m}$ , auf Grund dessen sie für den Einsatz in einer HPLC nicht geeignet sind. Polymere, die mittels Fällungs-Polymerisation hergestellt wurden, weisen eine homogenere Bindungsstellenverteilung sowie eine höhere Kapazität auf als entsprechende Bulk-Polymere (Tamayo et al., 2003; Cacho et al., 2004). Dabei beruht die homogenere Bindungsstellenverteilung vermutlich darauf, dass im Präpolymer die Ausbildung von verschiedenen Templat/Monomer-Stöchiometrien auf Grund des verdünnten Systems unterbunden wird. Die niedrigere Kapazität der Bulk-Polymere ist durch den Verlust an Bindungsstellen während des Mahlprozesses zu erklären.

### 2.1.6.5. Dispersions-Polymerisation

Bei der Dispersions-Polymerisation handelt es sich um eine modifizierte Fällungs-Polymerisation, wobei die Monomere, nicht aber die resultierenden Polymerpartikel, in der polaren kontinuierlichen Phase löslich sind (Sellergren, 1994c). Es werden Agglomerate, bestehend aus globulären Mikropartikeln, die eine mikroporöse oder mesoporöse Morphologie haben, synthetisiert. Die Agglomerate weisen einen Durchmesser kleiner 10  $\mu\text{m}$  auf. Die Mikropartikel sind zwischen 0,5  $\mu\text{m}$  und 4  $\mu\text{m}$  groß. Der Grad der Agglomeration sowie die durchschnittliche Partikelgröße variieren in Abhängigkeit von der Konzentration der Monomere sowie von der verwendeten kontinuierlichen Phase. Die Zugabe eines Stabilisators führt zu sphärischen Partikeln mit einer geringen Größenverteilung. Allerdings kann die polare kontinuierliche Phase polare Wechselwirkungen zwischen dem Templat und dem funktionellen Monomer stören.

### 2.1.6.6. Suspensions-Polymerisation

#### – Suspensions-Polymerisation in Wasser

Bei dieser Suspensions-Polymerisation wird das Präpolymer in einem vier- bis zehnfachen Überschuss an Wasser dispergiert (Matsui et al., 1997; Mayes & Mosbach, 1996; Ansell & Mosbach, 1997; Matsui et al., 2000; Pérez-Moral & Mayes, 2002). Zur Stabilisation der Präpolymertröpfchen wird dem Suspensionsmedium ein Stabilisator, wie Polyvinylalkohol, zugemischt. Die resultierende Partikelgröße von wenigen bis einigen hundert Mikrometern sowie die Größenverteilung von eng bis weit ist von verschiedenen physikalischen und chemischen Variablen abhängig, wie beispielsweise Phasenverhältnis, Natur des oberflächenaktiven Stoffes, Natur der Monomere, Scherungskräfte, Initiationssystem, Polymerisationstemperatur. Die Suspensions-Polymerisation in Wasser ist jedoch wenig geeignet für die molekulare Prägungen via Wasserstoffbrückenbindungen und andere polare Wechselwirkungen, da diese Wechselwirkungen durch das Wasser gestört werden. Der Stabilisator kann ebenfalls die Wechselwirkungen zwischen dem Templat und dem funktionellen Monomer stören. Des Weiteren können Verluste an Templat und funktionellen Monomer an das Suspensionsmedium auftreten, wenn diese im organischen Porogen aber auch in Wasser löslich sind. Daraus folgend wiesen Polymere, die mittels Suspensions-

Polymerisation in einer wässrigen Phase hergestellt wurden, eine geringere Affinität zum Zielmolekül auf als vergleichbare Bulk-Polymere.

### – Suspensions-Polymerisation in Perfluorokohlenwasserstoff

Mayes und Mosbach entwickelten 1996 eine Suspensions-Polymerisation, welche die Probleme, die mit Wasser als Suspensionsmedium bestehen, umgeht. Dafür verwendeten sie als kontinuierliche Phase, in der das Präpolymer dispergiert und polymerisiert wird, einen Perfluorokohlenwasserstoff, der nicht die Wechselwirkungen zwischen dem Templat und dem funktionellen Monomer stört sowie nicht mischbar mit dem Präpolymer ist. Die Partikeldurchmesser können in Abhängigkeit von der Rührgeschwindigkeit sowie der Menge an eingesetztem Stabilisator zwischen 5 und 50  $\mu\text{m}$  variieren. Weiterhin sind die Partikelgröße und die Oberflächenstruktur der Partikel vom verwendeten Porogen abhängig. Toluol und Aceton ergeben beispielsweise größere Partikel als Chloroform. Acetonitril ist dagegen nicht als Porogen geeignet, da es zu unregelmäßigen Aggregaten führt. Die mittels Suspensions-Polymerisation in Perfluorokohlenwasserstoff hergestellten Polymerpartikel zeigten gute chromatographische Wiedererkennungseigenschaften, die auf Grund des geringen Säulendrucks auch bei hohen Flussraten (5 ml/min) erzielt werden konnten. Allerdings stellte sich bei den Untersuchungen von Hu et al. (2005) heraus, dass die Bulk-Polymere in ihrer Selektivität und Adsorptionskapazität bessere Eigenschaften aufwiesen als die Polymere, die mittels Suspensions-Polymerisation in Perfluorokohlenwasserstoff hergestellt wurden. Darüber hinaus zeigen diese Polymere einen hohen Grad an nicht selektiven Bindungen, was darauf zurückgeführt werden kann, dass während der Polymerisation Perfluorokohlenwasserstoff kovalent an die Partikeloberfläche gebunden wird und in den späteren Untersuchungen mit dem Analyten reagiert (Ansell & Mosbach, 1997). Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt in den hohen Kosten für den Perfluorokohlenwasserstoff, obwohl dieser nach Destillation wieder verwendet werden kann.

### – Suspensions-Polymerisation in Mineralöl

Kempe und Kempe (2004; 2006) verwendeten als Suspensionsmedium ein weißes, zähflüssiges Mineralöl, so dass die Wechselwirkungen zwischen Templat und funktionellem Monomer nicht durch Wasser oder einen Stabilisator gestört werden. Hier werden 3 ml des Präpolymers, bestehend aus Templat, funktionellem Monomer, Quervernetzer, Initiator und Porogen, in 27 ml des Mineralöles überführt und bei 8000 upm für 20 s dispergiert. Nach Beendigung der Polymerisation unter UV-Bestrahlung bei 350 nm werden die Partikel mit



Chloroform und Aceton abfiltriert und gewaschen. Die Partikelgröße wird vom Volumenverhältnis des Präpolymers zum Mineralöl beeinflusst. Umfasst das Präpolymer 5% im Suspensionsgemisch, kann eine Transformation in sphärische Partikel mit einem Durchmesser kleiner als 100  $\mu\text{m}$  erzielt werden. Ist der Anteil des Präpolymers allerdings größer 30%, kommt es zur Phasenseparation und Koaleszenz der Tröpfchen, was zu Polymermonolithen und einem Granulat mit großem Durchmesser führt. Die Mischzeit sowie die Mischrate beeinflussen ebenfalls die Größe der Partikel, wobei deren Einfluss auf diese nur gering ist. Beim Vergleich der Polymerpartikel, die mittels der Suspensions-Polymerisation in Mineralöl hergestellt wurden mit vergleichbaren Bulk-Polymerpartikeln, konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der spezifischen Oberfläche, der Porengrößenverteilung oder des Porenvolumens festgestellt werden. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass nur Lösemittel als Porogene verwendet werden können, die unlöslich im Mineralöl sind. Somit sind beispielsweise Chloroform, Dichlormethan und Toluol nicht als porogenes Lösemittel geeignet. Acetonitril eignet sich dagegen gut als Porogen. Weiterhin ist nicht bekannt, ob das Mineralöl Spuren an Verbindungen enthält, die in das Präpolymer extrahieren.

### **2.1.6.7. Multi-Step-Swelling-Polymerisation**

Die Multi-Step-Swelling-Polymerisation wurde von Hosoya et al. (1993) sowie von der Gruppe um Haginaka entwickelt (Hosoya & Fréchet, 1993; Hosoya et al., 1996; Haginaka et al., 1998; Hosoya et al., 1999; Haginaka & Sakai, 2000; Haginaka & Sanbe, 2001; Haginaka & Kagawa, 2004). Dabei werden ungefähr 1  $\mu\text{m}$  große Initialpartikel mehreren Quellungsschritten unterzogen, indem Emulsionströpfchen aus einer Mikroemulsion in diese absorbiert werden. Bei der Mikroemulsion handelt es sich um ein aktivierendes Lösemittel, wie beispielsweise Dibutylphthalat, das einen Initiator enthält, in Wasser, wobei als Stabilisator Natriumdodecylsulfat dient. Die resultierende Dispersion wird zu einer zweiten Dispersion gegeben, die aus dem Präpolymer dispergiert in Wasser und dem Stabilisator Polyvinylalkohol besteht. Damit die Präpolymertröpfchen in die Initialpartikel absorbiert werden, wird das Dispersionsgemisch für mehrere Stunden gerührt. Danach wird die Dispersion mit einem inerten Gas durchströmt, um dann die Polymerisation zu initiieren. Über die experimentellen Bedingungen, wie z.B. das Volumenverhältnis der verschiedenen Dispersionsphasen, kann die Größe der monodispersen Partikel in einem Bereich von 2  $\mu\text{m}$

bis 50  $\mu\text{m}$  kontrolliert werden. Allerdings dient bei der labortechnisch aufwendigen Methode Wasser als kontinuierliche Phase, wodurch die Templat/Monomer-Wechselwirkungen gestört werden, wenn diese beispielsweise auf Wasserstoffbrückenbindungen basieren.

### **2.1.6.8. Core-Shell-Emulsions-Polymerisation**

Die Core-Shell-Emulsions-Polymerisation kann zur Oberflächenprägung verwendet werden (Pérez et al., 2000; Carter et al., 2003). Die molekular geprägten Polymerpartikel werden in einem wässrigen Medium synthetisiert, indem unter Anwesenheit des Templats verschiedene Schalen um einen Ausgangspartikel gebildet werden. Dafür wird zu den Initial-Partikeln, die sich in wässriger Lösung befinden, unter Rühren das Präpolymer hinzugefügt und im Anschluss die Polymerisation initiiert, die ebenfalls unter Rühren und Stickstoffatmosphäre erfolgt. Die strukturierte Morphologie der Partikel erlaubt es, in die Partikelschalen verschiedene Eigenschaften einzubauen, ohne dabei die Prägungsschale zu stören. Die resultierenden Partikel sind monodispers und können in einem kolloidalen Größenbereich von 0,05  $\mu\text{m}$  bis 2  $\mu\text{m}$  hergestellt werden. Da es sich aber bei der kontinuierlichen Phase um ein wässriges Medium handelt, können polare Templat/Monomer-Wechselwirkungen gestört werden.

### **2.1.7. Anwendungsbereiche für MIPs**

#### **2.1.7.1. Festphasenextraktion**

Vor der analytischen Trennung und Detektion ist es insbesondere bei Lebensmittelanalysen, biologischen Proben oder Umweltproben notwendig, den oft in geringer Konzentration vorliegenden Zielanalyten anzureichern sowie die Matrix, die bei der Detektion stören würde, abzutrennen. Dies ist vor allem für ein nachfolgendes Matrix-sensitives Detektionsverfahren, wie Massenspektrometrie, erforderlich. Die Festphasenextraktion, die in der Abbildung 2-8 schematisch dargestellt ist, ist ein Standardverfahren zur Analytenanreicherung aus komplexen Matrices, wobei der Zielanalyt an die feste Phase adsorbiert wird.

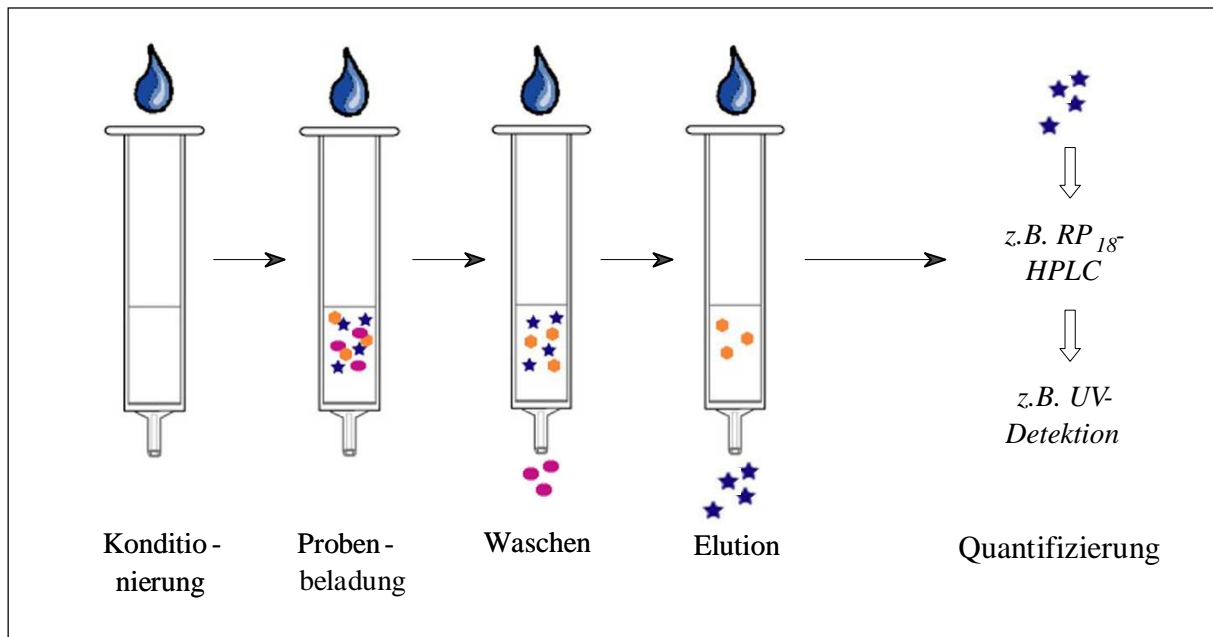


Abb. 2-9: Schematische Darstellung einer Festphasenextraktion

Es können zwei wesentliche Anwendungsformen unterschieden werden, die offline bzw. manuelle Festphasenextraktion, bei der sich das Sorbent in einer Kartusche befindet, und die online-Festphasenextraktion, die mit einem Separations- und Detektionssystem gekoppelt ist (Lanza & Sellergren, 2001; Möder et al., 2006). Da online-Protokolle vollständig automatisierbar sind, kann ein höherer Probendurchsatz erreicht werden, wobei gleichzeitig der Arbeits- und Kostenaufwand, die Probenkontamination, das Probenvolumen sowie die notwendigen Mengen an organischen Lösemitteln reduziert werden. SPE-Sorbentien werden in einer großen Vielzahl kommerziell angeboten. Für die Extraktion von unpolaren Analyten sind beispielsweise unpolare Sorbentien wie C8- oder C18-Materialien geeignet. Polymere mit Divinylstyrol-Anteilen erlauben dagegen die Extraktion unterschiedlicher polarer Substanzen, wobei die Analyten verstärkt durch Wasserstoffbrückenbindungen und dipolare Wechselwirkungen auf dem Sorbent zurückgehalten werden. Ionenaustauscher werden für die Extraktion von stark polaren Verbindungen und ionischen Komponenten als Festphase verwendet. Eine gute Selektivität kann mit Immunoaffinitätsphasen erreicht werden. Diese sind jedoch schwierig herzustellen sowie zu regenerieren, weisen eine begrenzte Stabilität auf und sind oftmals sehr teuer.

MIPs wurden 1994 von Sellergren erstmals als Sorbent in einer Festphasenextraktion verwendet (Sellergren, 1994a). Inzwischen sind in der Literatur verschiedene Anwendungsbeispiele für MIPs als SPE-Sorbent zu finden (Tab. 2-3). Weiterhin sind seit

kurzem SPE-Kartuschen, die mit einem MIP gepackt sind, zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung unter anderem von Chloramphenicol, Clenbuterol, Riboflavin oder Triazinen, kommerziell erhältlich (MIP Technologies, Lund, Schweden; Sigma-Aldrich Chemie GmbH).

Tab. 2-3: Literaturbeispiele für die Verwendung von MIPs als SPE-Sorbent

Literatur	Zielanalyt	Probe	Protokoll	Quantifizierung
Mullet & Lai, 1998	Theophyllin	Blutserum	online	HPLC-UV
Zander et al., 1998	Nikotin	Nikotin-Kaugummi	offline	HPLC-UV
Bjarnason et al., 1999	Triazine	Urin Apfelextrakt	online	HPLC-UV
Koeber et al., 2001	Triazine	Flusswasser	online	LC-MS
Martin-Esteban et al., 2001	Phenylharnstoff	Grundwasser, Bodenproben	offline	HPLC-UV
Pap et al., 2002	Terbutylazin	Flusswasser	offline	HPLC-UV
Caro et al., 2003	4-Chlorophenole 4-Nitrophenol	Flusswasser	online	HPLC-UV
Mena et al., 2003	Chloramphenicol	Milch, Augentropfen	offline	Voltammetrie
Xie et al., 2003	Pflanzenstoffe (z.B. Quercetin, Isorhambin)	Blutplasma	offline	HPLC-UV
Caro et al., 2004	Naproxen	Urin	offline	HPLC-UV
Möller et al., 2004	Diphenylphosphat	Urin	offline	LC-MS
Theodoridis et al., 2004	Koffein	Urin Getränke, Kaffee	online	HPLC-UV
Cobb & Andersson, 2005	Ropivacain	Blutplasma	offline	LC-MS

Die SPE-Kartuschen bzw. –Säulen sind laut Angaben in der Literatur mit 25 mg bis 500 mg MIP gepackt (Andersson, 2000a; Martin-Esteban, 2001). Somit muss entsprechend dem Totvolumen einer solchen MIP-SPE die Waschlösung mindestens 1 bis 2 ml umfassen, wenn diese dem 20fachen des Totvolumens entspricht. Dies bedeutet, dass der Retentionsfaktor des Analyten einen Wert größer 20 aufweisen muss (Pap et al., 2002). Da es sich bei der MIP-SPE um kurze chromatographische Säulen handelt, können die Ergebnisse einer vorangegangenen HPLC-Evaluierung sehr nützlich bei der Entwicklung einer Extraktionsmethode sein (Lanza & Sellergren, 2001). Der Analyt kann auf dem MIP selektiv aber auch nicht selektiv gebunden werden (Pap et al., 2002; Chapuis et al., 2003). Deshalb wird zur Probenbeladung das Lösemittel so gewählt, dass die Wechselwirkungen, die für die Bindung des Analyten an das MIP verantwortlich sind, stabilisiert werden. Werden während des Waschschrtes die polaren Wechselwirkungen genutzt, indem ein apolares Lösemittel

verwendet wird, können jedoch bei wässrigen Proben, auf Grund von Lösemittelvermischungen, Retentionsprobleme auftreten. Daher müssen diese Proben in ein apolares Lösemittel aufgenommen werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass nach der Aufbringung der wässrigen Probe die Kartusche trocken gesaugt wird, so dass die Wasser-Reste der Probe den Waschschriff nicht stören können. Im Falle von nicht selektiver Adsorption kann die wässrige Probe direkt auf die Kartusche gegeben werden, da im Anschluss mit einem selektiven Lösemittel gewaschen wird, das nur die nicht selektiven Wechselwirkungen der Matrixverbindungen, nicht aber die des Zielanalyten mit dem Polymer, stört (Sellergren, 1999; Lanza & Sellergren, 2001; Martin-Esteban, 2001; Pap et al., 2002). Somit hat der Waschschriff das Ziel, die selektiven Wechselwirkungen zwischen dem Zielanalyten und dem MIP zu maximieren und gleichzeitig störende Verbindungen, die nicht selektiv an das Polymer gebunden sind, zu eluieren. Während des Waschschriffes wird oft das gleiche Lösemittel wie während der Probenladung verwendet, wobei eine sorgfältige Optimierung bezogen auf pH, Ionenstärke und Lösemittel notwendig ist. Um eine hohe Anreicherung sowie Wiederfindung des Zielanalyten zu erhalten, muss der Analyt mit einem kleinen Lösemittelvolumen effizient von der Festphase eluiert werden. Dies kann durch einen Lösemittelwechsel oder durch Zugabe von einer Säure oder Base, die z.B. die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Zielanalyt und Polymermatrix stören, erreicht werden.

### **2.1.7.2. Andere Anwendungsbereiche**

In der Literatur sind unterschiedliche Anwendungsbereiche für MIPs beschrieben, wobei die Mehrzahl der Veröffentlichungen auf Separationen basieren. Allerdings ist die praktische Anwendung der MIPs in der Chromatographie, wie beispielsweise einer HPLC (Kempe & Mosbach, 1995; Kempe, 1996; Baggiani et al., 1997; Hosoya et al., 1998; Sellergren, 2001; Hwang & Lee, 2001; Huang et al., 2004), auf Grund breiter Peaks sowie Peakasymmetrien und der daraus resultierenden geringen chromatographischen Effizienz schwierig (Sellergren, 1994b; Andersson, 2000b). Molekular geprägte Membranen, bei denen beispielsweise auf einer PTFE-Matrix MIP-Partikel eingebunden sind, sind in der Extraktionstechnologie eine Alternative zu den SPE-Kartuschen (Suedee et al., 2004; Wang et al., 2004). Die einfach zu handhabenden Membranen erlauben eine hohe Probenflussrate, so dass auch größere Probenvolumina bearbeitet werden können. Wird das MIP in einem Sensor verwendet, wird

dieses in physikalischen Kontakt mit einem Signalumwandler gesetzt, so dass die physikochemische Antwort vom gebundenen Zielanalyten in ein Sensorsignal übersetzt wird (z.B. Massenveränderung, Widerstand, Kapazität, Brechungsindex) (Levi et al., 1997; McNiven et al., 1998; Kröger et al., 1999; Yano & Karube, 1999; Dickert et al. 2001; Luo et al., 2001; Gong et al., 2004). Des Weiteren finden MIPs als Katalysatoren Anwendung, wofür katalytische Gruppen, vergleichbar mit dem aktiven Zentrum eines Enzyms, an die Bindungsstellen des MIPs eingebaut werden (Wulff et al., 1997; Alexander et al., 1999; Ye et al., 1999b; Kim et al., 2000; Wulff, 2002; Liu & Wulff, 2004).

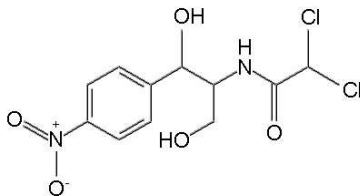
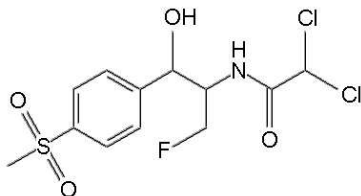
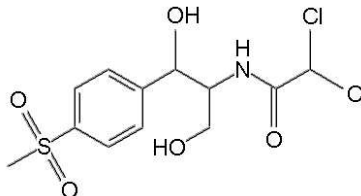
## **2.2. Chloramphenicol**

### **2.2.1. Struktur und Wirkung**

Das Breitbandantibiotikum Chloramphenicol wurde 1947 erstmals aus *Streptomyces venezuelae* isoliert (Ehrlich et al., 1947). Das Phenylethylamin-Derivat erscheint in feinen Kristallnadeln, die unbegrenzt in Ethanol aber nur schlecht in Wasser löslich sind (Yunis, 1988). Des Weiteren ist Chloramphenicol bei Raumtemperatur sehr stabil, bleibt aber auch in kochendem Wasser sowie über einen pH-Bereich von 0,4 bis 9,5 unbeeinflusst. Da das Molekül an der ersten und zweiten Stelle der Propandiol-Kette über zwei asymmetrische Kohlenstoffatome verfügt, existieren zwei Diastereoisomeren-Paare, die Erythro- und die Threo-Konfiguration. Allerdings weist nur das D-(–)-threo-Stereoisomer biologische Aktivität auf. Das Molekül Chloramphenicol sowie die strukturähnlichen antibiotisch wirksamen Moleküle Florfenicol und Thiamphenicol sind in der Tabelle 2-4 dargestellt.

Chloramphenicol ist aktiv gegen eine Vielzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie gegen Rickettsien, Mykoplasmen, Chlamydien, Leptospiren und Bakteroiden (Yunis, 1988; Holt et al., 1993). Beeinflussbare Organismen (Hemmung durch  $\leq 10 \mu\text{g/ml}$ ) sind Gruppe A und B Streptococci, *Streptococcus viridans*, Enterococci, *Neisseria*, *Haemophilus* Spezies, *Salmonella* und obligate Anaerobier. Bakterizid ist Chloramphenicol für *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae*.

Tab. 2-4: Chloramphenicol und strukturähnliche Verbindungen

Chloramphenicol	Florfenicol	Thiamphenicol
<b>Strukturformel</b>		
		
<b>Summenformel</b>		
$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	$C_{12}H_{14}Cl_2FNO_4S$	$C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$
<b>Molekulargewicht</b>		
323,13	358,21	356,22
<b>Synonym</b>		
Chloromycetin, Levomycetin, D-threo-2,2-Dichloro-N-[β-hydroxy-α-(hydroxymethyl)-4-nitrophenethyl]acetamid	Aquafen, Nuflor, [R-(R*,S*)]-2,2-Dichloro-N-[1-(fluoromethyl)-2-hydroxy-2-[4-(methylsulfonyl)phenyl]ethyl]acetamid	Methylsulfonyl Chloramphenicol D-threo-2,2-Dichloro-N-(β-hydroxy-α-[hydroxymethyl]-4-[methylsulfonyl]phenethyl)acetamid

Der Wirkungsmechanismus des Chloramphenicols basiert auf der Hemmung der Peptidsynthese, indem es an Rezeptoren der 50S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen bindet und somit die Peptidyltransferaseaktivität stört (Yunis, 1988; Holt et al., 1993). Eine Resistenz wird meistens durch R-Plasmid-induzierte Chloramphenicol-modifizierende Enzyme induziert, wobei es zur Acetylierung der 1- oder 3-ständigen Hydroxylgruppe des Chloramphenicols kommt. Da aber die Propandiol-Seitenkette für die stereospezifische Reaktion essentiell ist, hebt eine Modifikation dieser Gruppe die antibakterielle Aktivität des Moleküls auf.

### 2.2.2. Verwendung und Nebenwirkungen

Bis zu dem Zeitpunkt in den frühen 50iger Jahren, wo erste ernsthafte toxische Wirkungen bei Erwachsenen und Kinder berichtet wurden, wurde Chloramphenicol als Antibiotikum gegen Infektionen intensiv genutzt (Holt et al., 1993). Die gefährlichste Nebenwirkung des

Chloramphenicol basiert auf dessen Toxizität auf das Knochenmark und die daraus resultierende Hemmung der Blutbildung. Dabei müssen zwei verschiedenartige Störungen der Blutbildung unterschieden werden. Bei der Knochenmarksdepression handelt es sich um eine dosisabhängige, meist frühzeitig auftretende, reversible Unterdrückung der Blutbildung. Da Neugeborene und Säuglinge Chloramphenicol wesentlich langsamer metabolisieren, sind sie besonders gefährdet, wobei das klinische Bild als Grey-Baby-Syndrom bezeichnet wird. 1959 wurden die Ergebnisse einer Untersuchung zur Chemoprophylaxe an Frühgeborenen am Los Angeles County Krankenhaus veröffentlicht (Burns et al., 1959). Von 30 Frühchen, die eine intramuskuläre Dosis zwischen 100 und 165 mg/kg/d an Chloramphenicol erhielten, starben 19 (63%) und von 31 Frühchen, welche die gleiche Dosis Chloramphenicol plus Penicillin und Streptomycin erhielten, starben 21 (68%). Dagegen starben in der ersten Kontrollgruppe, die keine Antibiotika erhielten, von 32 Frühchen nur 6 (19%) und in der zweiten Kontrollgruppe, die nur Penicillin und Streptomycin erhielten, von 33 Frühchen nur 3 (9%). Von der reversiblen Knochenmarksdepression ist die sehr viel seltenere aplastische Anämie zu unterscheiden (Holt et al., 1993). Die aplastische Anämie stellt ein irreversibles Knochenmarkversagen dar, das nach einer Latenz auftritt und innerhalb von Wochen oder Monaten tödlich verlaufen kann. In einigen Fällen wird die Entstehung einer Leukämie als eine weitere Nebenwirkung diskutiert. Eine Schädigung der Blutbildung kann sich aber auch als schmerzhafte Rötung der Zunge oder der Mundschleimhaut bzw. als punktförmige Haut- oder Schleimhautblutung bemerkbar machen. Andere Nebenwirkungen des Chloramphenicols sind Übelkeit, Erbrechen, Diarrhöe, Kopfschmerzen, Depressionen, eingeschränkte Augenbeweglichkeit, Geschmackstörungen sowie Leber- und Nierenfunktionsstörungen vor allem bei vorbestehenden Erkrankungen. Nach längerer Behandlung kann es in selten Fällen zu Nervenentzündungen kommen. Des Weiteren können Ampicillin-resistente *Haemophilus influenzae* und Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* Stämme die Folge einer vermehrten Anwendung von Chloramphenicol, insbesondere bei der Behandlung von frühkindlicher Meningitis, sein.

Auf Grund der beschriebenen Nebenwirkungen wird Chloramphenicol nur als Reserveantibiotikum und nicht als Standardantibiotikum in der Humanmedizin verwendet. Hauptanwendungsgebiete sind dabei schwere, sonst nicht zu beherrschende Infektionskrankheiten wie beispielsweise Typhus, Paratyphus, Pest, Fleckfieber, Ruhr, Diphtherie und Malaria. Da es sich aber beim Chloramphenicol um ein preisgünstiges und effektives Antibiotikum handelt, ist es im human- und veterinärmedizinischen Bereich von



Interesse. Dies verdeutlichen zum Beispiel die Untersuchungen zum Risiko einer hämatologischen Toxizität, die chloramphenicolhaltigen Augentropfen zugeordnet werden kann (Lancaster et al., 1998). Dabei traten 3 Fälle einer hämatologischen Toxizität pro 442543 Patienten bzw. pro 674148 Verschreibungen auf.

### **2.2.3. Rechtliche Grundlagen**

Auf Grund der gesundheitlichen Bedenken wurde 1994 Chloramphenicol in den Anhang IV der Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 aufgenommen (Hey, 2003). Demnach ist die Anwendung von Chloramphenicol bei Lebensmittel liefernden Tieren innerhalb der Europäischen Union grundsätzlich verboten. Nach Artikel 5 der oben genannten Verordnung ist eine Aufnahme in das Verzeichnis des Anhangs IV vorzunehmen, wenn für Rückstände von pharmakologisch wirksamen Stoffen keine Höchstmengen festgesetzt werden können, weil Rückstände des betreffenden Stoffes in Lebensmitteln tierischen Ursprungs in jeder Konzentration eine Gefahr für die Gesundheit des Verbrauchers darstellen können. In der Entscheidung 2002/657/EG legte die EU-Kommission zusätzlich eine Mindestleistungsgrenze (Minimum Required Performance Limit, MRPL-Wert) fest (Richtlinie 96/23/EG). Dieser Wert ist der Mindestgehalt eines Stoffes in einer Probe, der mindestens nachgewiesen und bestätigt werden muss. Er soll die analytische Leistungsfähigkeit von Methoden für Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, harmonisieren. Für die Matrices Fleisch, Eier, Milch, Aquakulturerzeugnisse und Honig nennt die Entscheidung 2003/181/EG eine Mindestleistungsgrenze von 0,3 µg/kg für Chloramphenicol.

### **2.2.4. Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol**

In der Literatur wurden, wie nachstehend dargestellt, verschiedene Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol beschrieben.

- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Diese Screening-Methode liefert sehr verlässliche Ergebnisse für Negativbefunde. Positivbefunde müssen jedoch durch die Analyse mit einer zweiten Methode abgesichert werden (Impens et al., 2003; Scortichini et al., 2005; Shen & Jian., 2005).

- Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie wird Chloramphenicol entweder auf Grund seiner natürlichen gelb-grünen Farbe visuell detektiert oder die durch Besprühen mit Fluorescamin entstehenden fluoreszierenden Derivate werden bei 366 nm analysiert (Abjean, 1997).

- Gaschromatographie

Zur Gaschromatographie müssen schwerflüchtige Analyten durch Derivatisierung, wie beispielsweise Silylierung der polaren funktionellen Gruppe, in die Gasphase überführt werden (Botsoglou & Fletouris, 2001). Da die Chloratome des Chloramphenicols über eine starke Elektronenaffinität verfügen, ist eine Detektion mittels Elektroneneinfang-Detektor (ECD) möglich (Shen & Jian., 2005). Die Analyse mit GC-MS ist ebenfalls häufig zu finden (Impens et al., 2003; Shen & Jian., 2005; Xie et al., 2005).

- Flüssigchromatographie

Auf Grund des starken Absorptionsvermögens für ultraviolette Strahlung kann Chloramphenicol direkt ohne weitere Derivatisierung mittels UV-Detektion bei 270 – 290 nm analysiert werden (Roudaut, 1996; Boulaire et al., 1997; Shen & Jian., 2005). Allerdings ist die Sensitivität der UV-Detektion nicht ausreichend, um Chloramphenicol in dem gesetzlich geforderten Konzentrationsbereich nachzuweisen. Wird Chloramphenicol nach chromatographischer Abtrennung von der Matrix mittels Massenspektroskopie, bei der das isolierte Molekül energetisch angeregt und fragmentiert wird, detektiert, kann eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit erreicht werden (Impens et al., 2003; Takino et al., 2003; Van De Riet et al., 2003; Penny et al., 2005; Grotewahl, 2006). Die LC-MS/MS-Technik ist insbesondere zur Spurenanalytik komplexer Matrices geeignet, da die nach der energetischen Anregung und Fragmentierung erhaltenen Tochterionen erneut isoliert und angestoßen werden, so dass das Signal/Rausch-Verhältnis sowie die Selektivität verbessert wird (Hübschmann, 1996; Ortelli et al., 2004; Forti et al., 2005; Grotewahl, 2006; Quon, 2006; Rønning et al., 2006; Nicolich et al., 2006).

### 2.2.5. MIP-basierte Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol

In der Literatur gibt es mehrere Beispiele, bei denen MIPs zur Bestimmung von Chloramphenicol Anwendung finden. Diese werden in der Tabelle 2-5 gegenübergestellt. Die niedrigste Nachweisgrenze mit 0,01 µg/ml erzielt das MIP[4] SPE<sup>TM</sup> CAP von MIP Technologies (Lund, Schweden). Allerdings ist auch diese nicht ausreichend, um die gesetzlich geforderte Mindestleistungsgrenze von 0,3 µg/kg zu erfüllen (Richtlinie 96/23/EG).

Tab. 2-5: Literaturvergleich Chloramphenicol geprägter Polymere

	Levi et al., 1997	McNiven et al., 1998	Suárez-Rodríguez & Díaz-García, 2001	Mena et al., 2003	MIP[4] SPE <sup>TM</sup> CAP*
<b>Probenmatrix</b>	Serum	Serum	–	Milch, Augentropfen	Milch, Milchpulver
<b>Einsatzbereich</b>	LC-basierter Sensor	LC-basierter Sensor	Durchflusszellen- Detektor	SPE	SPE
<b>Quantifizierung</b>	UV-Detektion bei 460 nm	UV-Detektion bei 460 nm	Spektrofluori- metrie	voltammetr. Detektion	LC-MS/MS
<b>Lösungsmittel zur CAP-Retention</b>	Acetonitril	Acetonitril	Acetonitril	wässriges Milieu	wässriges Milieu
<b>Nachweisgrenze</b>	5 µg/ml	5 µg/ml	8 µg/ml	0,015 µg/ml	0,01 µg/ml
<b>Lineare Antwort im Bereich von</b>	3 – 1000 µg /ml	3 – 1000 µg /ml	8 – 100 µg/ml	0,1 – 32,3 µg/ml	
<b>Wiederfindung</b>				90% ± 11 bis 103% ± 2	< 80%

\* MIP Technologies AB, Lund, Schweden (Angaben gemäß Produktinformation)

Die Wechselwirkungen zwischen Chloramphenicol und den Bindungsstellen in der Polymermatrix basieren überwiegend auf den Hydroxylgruppen des Chloramphenicols (Levi et al., 1997; McNiven et al., 1998). Somit führt Acetylierung der Hydroxylgruppen, wie es beim Chloramphenicol-Diacetat der Fall ist, zu einem Verlust der Wechselwirkungen. Die Substitution der Nitrogruppe, wie beim Thiamphenicol, oder der Dichloracetylgruppe, wie beim Chloramphenicol-Methylrot, führt ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Affinität zum Polymer (Levi et al., 1997). Da die Wechselwirkungen auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhen, führt die Zugabe eines Wasserstoffbrückenbindungen störenden Lösemittels, wie Ethanol oder Methanol, zum Acetonitril, zu einer deutlichen Abnahme der Chloramphenicol-Retention (Levi et al., 1997; Suárez-Rodríguez & Díaz-

García, 2001). Weiterhin führt eine Erhöhung des pH-Wertes auf über 9 im wässrigen Milieu auf Grund der Deprotonierung der Hydroxylgruppen des Chloramphenicols zu einer verminderten Retention (Mena et al., 2003).

Levi et al. (1997) und McNiven et al. (1998) entwickelten zur Bestimmung von Chloramphenicol einen auf Flüssigchromatographie basierenden Sensor. Dieser beruht auf der kompetitiven Entfernung von Chloramphenicol-Methylrot, das sich in den selektiven Bindungskavitäten des MIPs befindet, durch den Analyten und dessen Detektion bei 460 nm. Es wurden Polymere mit dem funktionellen Monomer DEAEMA, MAA oder AA getestet. Die molaren Verhältnisse von funktionellen Monomer zum Templat Chloramphenicol betrugen 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 und beim MAA zusätzlich noch 8:1. Signifikante Ergebnisse konnten aber nur mit dem Polymer, das mit DEAEMA und einem funktionellen Monomer/Templat-Verhältnis von 2:1 und 4:1 hergestellt wurde, erzielt werden. Chloramphenicol konkurrierte mit dem polymergebundenen Chloramphenicol-Methylrot effektiver als Thiamphenicol. Chloramphenicol-Diacetat konnte auf Grund des Fehlens von geeigneten funktionellen Gruppen nicht detektiert werden (Levi et al., 1997). Zur Vereinfachung der Sensormethode wendeten McNiven et al. (1998) neben der Bulk-Polymerisation eine in-situ Technik an, bei der das Präpolymer direkt in eine leere LC-Säule gefüllt wurde und in dieser polymerisierte. Die Leistungsfähigkeit des Polymermonolithen war mit der des Bulk-Polymers vergleichbar. Dagegen war die Kapazität signifikant niedriger. Die Fähigkeit zur Separation des Thiamphenicols vom Chloramphenicol war geringfügig besser als unter Verwendung des Bulk-Polymers.

Suárez-Rodríguez und Díaz-García (2001) verwendeten zur Chloramphenicol-Bestimmung ein optimiertes MIP als Wiedererkennungssphase in einer 25 µl Durchflusszelle zur kompetitiven Detektion mit einem fluoreszierenden Chloamphenicol-Derivat. Zur MIP-Optimierung wurden verschiedene Polymere synthetisiert und mittels eines HPLC-Systems bewertet. Die funktionellen Monomere AA, DEAEMA, HEMA, MAA, 2VPy sowie Gemische aus DEAEMA und 2VPy wurden getestet. Die Retentions- und Prägungsfaktoren für Chloramphenicol waren auf den Polymeren, die mit AA ( $K=4,22$  ;  $IF=1,38$ ), HEMA ( $K=0,27$  ;  $IF= 1,69$ ) oder MAA ( $K=0,33$  ;  $IF=1,14$ ) synthetisiert wurden gering. Mit den funktionellen Monomeren DEAEMA oder 2VPy konnten für Chloramphenicol Retentionsfaktoren von 12,83 bzw. 13,21 und Prägungsfaktoren von 4,95 bzw. 22,02 erzielt werden. Die höchsten Retentionsfaktoren wurden auf dem Polymer erreicht, das eine

DEAEMA/2VPy-Mischung im molaren Verhältnis 25:75 und ein molares Monomer/Templat-Verhältnis von 2:1 aufwies. Dieses Polymer diente als optimiertes MIP in den nachfolgenden Untersuchungen. Weiterhin untersuchten Suárez-Rodríguez und Díaz-García (2001) den Einfluss der mobilen Phase auf die Chloramphenicol-Retention. Dabei führten geringe Methanol-Mengen im Acetonitril zu einer deutlichen Abnahme der Chloramphenicol- aber auch Thiamphenicol-Retention, was darauf hindeutet, dass die Selektivität auf Wasserstoffbrückenbindungen basiert.

### 2.3. Nisin

#### 2.3.1. Struktur und Wirkung

Nisin kommt natürlicherweise in Milch und Käse aber auch im menschlichen Darm vor, wobei es von verschiedenen *Lactococcus lactis* Stämmen wie beispielsweise *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* gebildet wird (Hurst, 1981; Hansen, 1997).

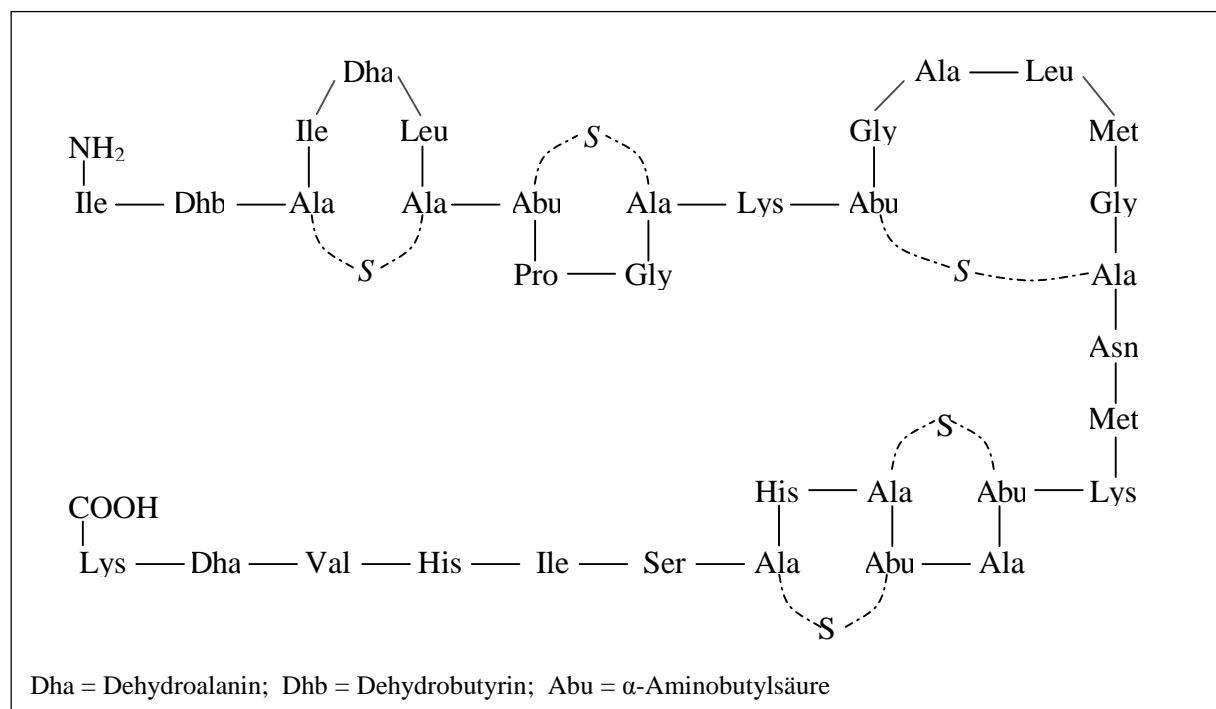


Abb. 2-10: Struktur von Nisin A

Beim Nisin handelt es sich um ein kleines (3353 Da), kationisches Peptid, das aus 34 Aminosäureresten besteht (Abb. 2-10). Das ribosomal synthetisierte und posttranslational modifizierte Peptid ist dadurch charakterisiert, dass es vier intramolekulare  $\beta$ -Methyllanthionin-Ringe, ein Lanthionin-Ring und die seltenen Aminosäuren Dehydroalanin und Dehydrobutyrin enthält. Daher gehört Nisin zu den Klasse I Bakteriocinen, den sogenannten Lanthibiotikas (Hurst, 1981; Hansen, 1997). Das Molekül enthält am N-terminalen Ende hydrophobe Aminosäurereste. Das C-terminale Ende ist auf Grund der Lysin- und Histidin-Reste hydrophiler. Da Nisin keine Aminosäurereste mit negativ geladener Seitenkette aufweist, liegt es über einem weiten pH-Bereich in positiver Ladung vor (Rollema et al., 1995). Des Weiteren beinhaltet es keine aromatischen Aminosäuren, so dass die photometrische Detektion nur im Spektralbereich um 210 nm erfolgen kann (Hurst, 1981). Vom Nisin existieren zwei natürliche Varianten, Nisin A und Nisin Z (Hurst, 1981; Hansen, 1997). Diese unterscheiden sich nur im Aminosäurerest an der Position 27, an der Nisin A Histidin und Nisin Z Asparagin aufweist, so dass die beiden Varianten eine ähnliche Struktur sowie ein ähnliches antimikrobielles Spektrum besitzen. In getrockneter Form liegt Nisin als weißes kristallines Pulver vor, das über Jahre hinweg stabil ist (Rollema et al., 1995). In Lösung ist Nisin bei Raumtemperatur in einem pH-Bereich von 2 bis 6 relativ stabil, wobei die höchste Löslichkeit und Stabilität bei einem niedrigen pH-Wert besteht. Ab einem pH-Wert von 7 ist eine starke Abnahme der Nisin-Stabilität zu beobachten, da im basischen Bereich die ungesättigten Aminosäurereste Dehydroalanin und Dehydrobutyrin einer Reihe von Additionsreaktionen unterliegen können. Gegenüber Labenzym bleibt Nisin stabil, auf Grund dessen es sich für die Verwendung in der Käseproduktion eignet.

Nisin ist gegenüber einer Vielzahl von grampositiven Bakterien aktiv, wie z.B. Lactobazillen, Streptococcen, Staphylococcen, Mikroccoccen, Clostridien und anderen anaeroben Sporenbildnern, wobei die Sporen empfindlicher als die vegetativen Zellen sind (Delves-Broughton, 1990; Hansen, 1997). Verschiedene Studien zeigen, dass Lebensmittelpathogene wie *Listeria monocytogenes* ebenfalls empfindlich gegenüber Nisin sind. Schimmelpilze, Hefen sowie gramnegative Bakterien werden vom Nisin nicht gehemmt. Die Wirkung des Nisins beruht auf Wechselwirkungen mit den Phospholipiden der bakteriellen Zellmembran, wodurch die Anordnung der Fettsäuren gestört wird (Ruhr & Sahl, 1985; Cha & Chinnan, 2003). Dies kann zum direkten Einbau des Nisins sowie zur Ausbildung von Ionenkanälen in die zytoplasmatische Membran des Zielorganismus führen.

### **2.3.2. Verwendung**

#### **2.3.2.1. Konservierung von Lebensmitteln**

Nisin wird bei Hartkäse und vor allem bei Schmelzkäse gegen Weißfäule sowie gegen Buttersäure bildende und damit Fehlgärungen und/oder Spätblähungen verursachende Bakterien eingesetzt (Hansen, 1997; Sallami et al., 2004). Bei hitzebehandelten Produkten, wie beispielsweise Gemüsekonserven, erlaubt die Verwendung von Nisin mildere Sterilisationsbedingungen, was zur Verbesserung des Aromas, Erscheinungsbildes und natürlichen Wertes sowie zur Minimierung der Prozesskosten führt. Weitere Anwendungsbereiche als Konservierungsstoff sind Bier, Wein, Getränke, Kakao, Milchprodukte, Fleischprodukte, Gemüse. Allerdings kann die Aktivität des Nisins durch verschiedene Prozesse, wie beispielsweise Kochen, enzymatische Aktivität oder Wechselwirkungen mit anderen Verbindungen, im Lebensmittel reduziert werden. Dieses Problem kann umgangen werden, indem Nisin in das Verpackungsmaterial integriert bzw. dieses mit Nisin beschichtet wird. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass Nisin bei dieser Anwendung keinen direkten Zusatz zum Lebensmittel darstellt (Cha & Chinnan, 2003; Luchansky & Call, 2004; Marek et al., 2004).

#### **2.3.2.2. Medizinische Applikationen**

Nisin wird großes Potential in der Entwicklung neuer Medikamente sowie für weitere medizinische Applikationen zuerkannt. Es könnte zum Beispiel gegen bestimmte Infektionen im Gastrointestinaltrakt genutzt werden, wie *Helicobacter pylori* (Mather & McClean, 2006), *Enterococcus faecalis* oder *Streptococcus gordonii* (Turner et al., 2004). Die Untersuchungen von Aranha et al. (2004) beschäftigten sich mit der Eignung des Nisins als Empfängnisverhütungsmittel. Dabei konnte gezeigt werden, dass Nisin in Abhängigkeit von Dosis und Zeit die Beweglichkeit von Spermien vollständig hemmt.

### 2.3.3. Toxizität

Der ADI-Wert des Nisins beträgt 0,13 mg/kg. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass Nisin innerhalb der empfohlenen Konzentrationen für den Menschen nicht toxisch ist und nur geringe immunogene Eigenschaften zeigt (Hurst, 1981; Hansen, 1997). Kordel und Sahl (1986) berichteten, dass Nisin im millimolaren Konzentrationsbereich zytotoxisch auf eukaryotische Zellen, wie beispielsweise menschliche Lungenfibroblasten und Erythrozyten, wirken kann. Mather und McClean (2006) fanden nur eine geringe Zytotoxizität des Nisin A auf Gastrointestinalzellen. Die von Aranha et al. (2004) durchgeführten subakuten Toxizitätsstudien an Ratten deuten darauf, dass eine wiederholte intravaginale Anwendung von Nisin in Dosen von 200 µg an 14 fortlaufenden Tagen keine Veränderung der Zykluslänge, histopathologische Abnormalitäten des Vaginalgewebes oder biochemische Veränderungen im Blut oder Serum induziert. Somit wirkte sich Nisin in dem Konzentrationsbereich, der notwendig ist, um Bakterien abzutöten, nicht toxisch auf Erythrozyten aus. Des Weiteren wurden bei diesen Rattenversuchen keine nachteiligen Effekte auf die Fortpflanzungsleistung sowie die Überlebensrate von Neugeborenen und deren weitere Entwicklung festgestellt. Grundsätzlich ist die Anwendung von antimikrobiell wirksamen Substanzen zur Lebensmittelkonservierung problematisch, da die Entwicklung resistenter Mikroorganismenstämme ihren Einsatz in der Medizin stören können.

### 2.3.4. Rechtliche Grundlage

Innerhalb der Europäischen Union ist Nisin als Konservierungsmittel zugelassen. Es ist als E-Nummer 234 gelistet und kann auch als Nisin-Konservierungsmittel oder natürliches Konservierungsmittel deklariert werden (Cleveland et al., 2001). Die Zusatzstoff-Zulassungsverordnung Anlage 5 Teil C gibt die Maximalgehalte des Nisins in den jeweiligen Endprodukten wie folgt vor (Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998 Teil I Nr. 8):

- Grieß- und Tapiokapudding und ähnliche Erzeugnisse – max. 3 mg/kg
- Clotted Cream, Mascarpone – max. 10 mg/kg
- gereifter Käse, Schmelzkäse – max. 12,5 mg/kg.



### 2.3.5. Methoden zur Bestimmung von Nisin

In der Literatur wurden verschiedene Methoden für die analytische Bestimmung von Nisin publiziert. Diese eignen sich aber für die Überwachung der Höchstmengenregelung teilweise nur mit Einschränkungen.

#### – Immunologische und biologische Untersuchungsmethoden

Es gibt eine Vielzahl von Methoden, die auf immunologischen Methoden basieren wie ELISA (Falahee et al., 1990; Leung et al., 2002), flow-ELISA (Nandakumar et al., 2000), Immunoaffinitäts-Chromatographie (Suarez et al., 1997) oder Immunodot-Detektion unter Verwendung von Chemilumineszenz (Bouksamin et al., 1998). Weiterhin sind in der Literatur verschiedene Bioassays zur Bestimmung von Nisin vorhanden (Reunanen & Saris, 2003; Hakovirta, 2006).

#### – Kapillaronenelektrophorese

Rossano et al. (1998) beschrieben eine Methode, welche die Technik der Kapillaronenelektrophorese zur Bestimmung von Nisin in Milch nutzte. In dem Bereich von 10 µg/ml bis 100 µg/ml betrug der Korrelationskoeffizient 0,9996. Außerdem konnte ein Variationskoeffizient von 3,8% erreicht werden. Die Sensitivität betrug 10 µg/ml.

#### – Flüssigchromatographie

Zur Bestimmung von Nisin im Wein entwickelten Pfeiffer und Orben (1997) eine chromatographische Methode. Dabei wurde zur Nisin-Anreicherung die Probe zuerst über eine Kationenaustausch-Extraktionssäule gegeben. Die Abtrennung der verbleibenden Probenmatrix erfolgte mittels HPLC an einer C4-Säule mit anschließender spektralphotometrischer Quantifizierung bei 210 nm. Die Nachweisgrenze betrug weniger als 1 mg/l. Die Wiederfindung für die Modelllösungen lag bei über 90% und für die untersuchten Weine zwischen 74% und 97%. Berger et al. (2005) detektierten Nisin im gereinigten Käseextrakt nach Trennung auf einer Polymerphase mittels Massenspektrometrie. Zur Probenaufbereitung wurde das zerkleinerte Käseprobenmaterial mit 0,5%iger Ameisensäure extrahiert. Störende Proteine wurden mittels Filtration durch ein Molekularsieb (z.B. Centricon YM-30) oder Gelchromatographie (z.B. Macherey Nagel Nucleogel GFC 300) abgetrennt. Die Bestimmungsgrenze lag im Bereich von 0,5 mg/kg bis 1 mg/kg. Die

Wiederfindung betrug zwischen 58% und 81%. Der Variationskoeffizient zeigte nach Aufarbeitung mittels Molekularsieb einen Wert von 3,3% und nach Aufarbeitung mittels Gelchromatographie einen Wert von 13%.

### – MIP-basierte Methoden zur Bestimmung von Nisin

Bisher existieren in der Literatur keine Methoden, die zur Bestimmung von Nisin MIPs verwenden.

## **2.4. Bioaktive Peptide**

### **2.4.1. Wirkung und Bedeutung**

Bioaktive Peptide liegen in inaktiver Form in der Primärstruktur der höhermolekularen Proteine vor und werden erst durch enzymatische Spaltung als Fragmente aus den Proteinen freigesetzt. Die reichste Quelle an bioaktiven Peptiden stellen die Milchproteine dar (Meisel & FitzGerald, 2003; Meisel, 2005), wobei auch andere Nahrungsproteine biologisch aktive Aminosäuresequenzen enthalten (Dziuba et al., 1999). Die Freisetzung der bioaktiven Peptide kann während der intestinalen Verdauung in das Darmlumen oder während der Herstellung, wie beispielsweise der Käse- reifung, stattfinden, so dass die Aufnahme als Nahrungsbestandteil erfolgt (Meisel & FitzGerald, 2003; Meisel, 2005). Die möglichen physiologischen Wirkungen der bei der intestinalen Verdauung von Nahrungsproteinen freigesetzten bioaktiven Peptide bestehen in der Beteiligung an der Regulation der Nährstoffaufnahme sowie der Beeinflussung des Stoffwechsels durch Stimulierung der Sekretion verschiedener Hormone. Folglich besitzen einige Nahrungsproteine neben dem synthetischen Wert als Bausubstrat einen funktionellen Wert als Wirkstoff, was in der Abbildung 2-11 dargestellt ist. Auf Grund der biologischen Aktivität ergeben sich für die bioaktiven Peptide pharmazeutische aber auch diätetische Anwendungsmöglichkeiten beispielsweise als funktionelle Nahrungsmittel bzw. Nutraceuticals zur Minimierung von Krankheitsrisiken oder zur Verbesserung bestimmter physiologischer Funktionen. Bioaktive Peptide, die im bovinen Milchprotein verschlüsselt sind, können im Industriemaßstab hergestellt werden.

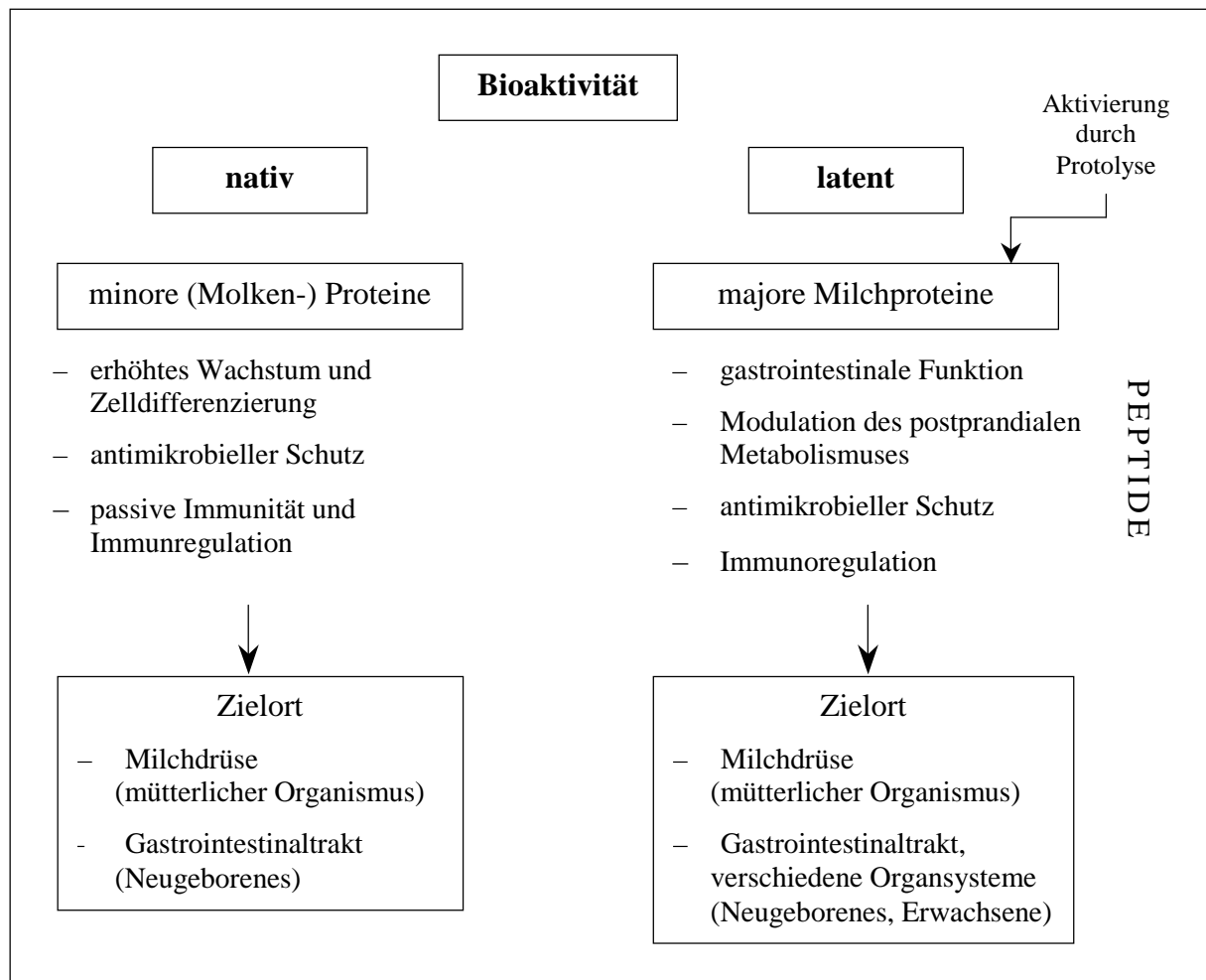


Abb. 2-11: Milch stellt eine biologische aktive Flüssigkeit dar, die regulatorische Proteine und Peptide enthält (Meisel, 2005)

Bioaktive Peptide sind potentielle Modulatoren verschiedener regulativer Prozesse im Körper, wobei mehrere milchabgeleitete Peptide multifunktionelle Eigenschaften aufweisen.

### – Immunomodulierende Peptide

Bei der Mehrzahl der immunomodulierenden Peptide handelt es sich um hydrolysierte Derivate der Hauptmilchproteine (Gill et al., 2000). Solche Immuno peptide können als Immunstimulanzien wirken, indem sie die Bildung oder Aktivität von bestimmten Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise T-Zellen, die zur Erkennung körperfremder Substanzen beitragen oder Phagozyten, die körperfremde Zellen vernichten, stimulieren. Ein Beispiel sind die immunopotentiellen Di- und Tripeptide Tyr-Gly und Tyr-Gly-Gly, die bei pre-AIDS-Patienten einen Schutz vor Infektionen bewirken, da diese die Proliferation und Proteinsynthese der Lymphozyten stimulieren (Hadden, 1991).

### – Zytomodulierende Peptide

Verschiedene Caseinfragmente, unter anderem aus Joghurt, zeigen antiproliferative Effekte auf Tumorzellen (Hata et al., 1998). Weiterhin können aus verschiedenen Milchproteinen Peptide entstehen, die das Zellwachstum stimulieren (Hagiwara et al., 1995) und somit beispielsweise zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren die Entwicklung des Gastrointestinaltraktes von Neugeborenen fördern (Meisel, 2005).

### – Antimikrobiell wirkende Peptide

Antimikrobiell wirkende Peptide sind in der Sequenz des minoren Molkenproteins Lactoferrin enthalten (Tomita et al., 1991). Die antimikrobielle Wirkung des intakten Lactoferrins wird auf die Fähigkeit zur Eisen-Ionen-Bindung zurückgeführt (Bellamy et al., 1993). Das antimikrobielle Lactoferrin-Fragment Lactoferricin enthält keine Bindungsstellen für Eisen-Ionen. Jedoch ist es durch einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren, die eine positive Nettoladung des Peptids ergeben, charakterisiert. Kationische Peptide können Mikroorganismen abtöten, indem sie eine erhöhte Durchlässigkeit der mikrobiellen Zellmembran bewirken.

### – Antihypertensive Peptide

Die antihypertensiven Peptide wurden als Fragmente von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein (Casokinine) (Meisel & Schlimme, 1994) und des Molkenproteins  $\beta$ -Lactoglobulin (Lactokinine) sowie in Sequenzen anderer Nahrungsproteine identifiziert (FitzGerald & Meisel, 1999). Diese Peptide können zu einer Senkung des Blutdrucks führen, indem sie das Angiotensin-Umwandlungsenzym (ACE) hemmen (Meisel, 2005). Dadurch wird die Aktivierung des Angiotensins, welches die stärkste bekannte blutdrucksteigernde Verbindung im Organismus ist, verhindert. Da das Angiotensin-Umwandlungsenzym ein multifunktionelles Enzym ist, können ACE-hemmende Peptide auch auf verschiedene Systeme des Organismus zur Regulation der Immunabwehr und der Informationsübertragung im Nervensystem einwirken.

### – Opioid Peptide

Die Wirkung der opioiden Peptide im Organismus kommt durch eine spezifische Wechselwirkung mit Opiat-Rezeptoren, die vor allem im Darm und im Nervengewebe lokalisiert sind, zustande. Opioid Peptide modulieren den postprandialen Metabolismus durch Stimulation der Insulin- und Somatostatin-Sekretion (Schusdzarra et al., 1983), verlängern die gastrointestinale Passagezeit und erhöhen die Wasser- und Elektrolyten-

Resorption, wodurch Durchfallerkrankungen entgegengewirkt wird (Daniel et al., 1990). Es können agonistische und antagonistische opioide Peptide unterschieden werden (Meisel, 2005). Die agonistisch wirkenden Casomorphine und Lactorphine setzen durch Bindung an einen entsprechenden Rezeptor eine biologische Wirkung in Gang. Dagegen führt die Bindung von Antagonisten, wie Casoxine und Lactoferroxine, zu einer Blockierung der Rezeptoren.

### – Mineralbindende Peptide

Phosphopeptide, die als Fragmente von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein chemisch charakterisiert wurden, besitzen die Fähigkeit, Organophosphat-Salze zu bilden, so dass sie als Carrier für verschiedene Mineralien fungieren (Sato et al., 1986). Durch z.B. ihr Calcium-Bindungsvermögen verhindern sie die Fällung von unlöslichem Calcium-Phosphat im Darmlumen und erhöhen damit den Anteil an gelöstem, potentiell resorbierbarem Calcium. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Calcium-bindende Phosphopeptide einer kariösen Schädigung der Zähne entgegenwirken, da diese die Remineralisierung des Zahnschmelzes fördern (Reynolds, 1997).

### – Antithrombotische Peptide

Antithrombotische Peptide können vom C-terminalen Teil des bovinen  $\kappa$ -Caseins abgeleitet werden. Diese Casoplateline hemmen die Fibrinogen-Bindung an die spezifische Rezeptorregion an der Thrombozytenoberfläche und hemmen somit die Aggregation der Thrombozyten (Jollè et al., 1986). Allerdings ist die physiologische Bedeutung dieser Peptide bisher nicht bekannt.

## **2.4.2. MIP-basierte Methoden zur Bestimmung von Peptiden**

Es existieren mehrere Methoden zur Separation von Peptiden, welche die Technik der Flüssigchromatographie verwenden. Bei der Umkehrphasenchromatographie sind häufig verwendete stationäre Phasen Octylsilan (C-8) oder Octadecylsilan (C-18). Da diese Umkehrphasen relativ unpolar sind, werden als mobile Phasen polare Lösemittel bzw. Lösemittelmischungen eingesetzt. Der hydrophobe Trennmechanismus beruht auf der

Anziehung durch Van-der-Waals-Kräfte, wobei der Analyt um so stärker von der stationären Phase angezogen wird je unpolarer dieser ist, so dass polare Verbindungen früher eluiert werden als unpolare. Die Ionenaustauschchromatographie beinhaltet eine Trennsäule, die mit einem negativ oder positiv geladenen Harz gepackt ist, so dass die Analyten als Anionen bzw. Kationen injiziert werden. Folglich basiert hier die Separation auf Ladungsaustausch.

Auf MIPs basierende Methoden zur Quantifizierung von Peptiden sind in der Literatur bisher nur vereinzelt zu finden. Eine Ursache dafür stellt die eingeschränkte Stabilität der Peptide unter Polymerisationsbedingungen dar, die zum Verlust an Peptidbindungen, Aminosäureresten aber auch der dreidimensionalen Struktur führen kann (Schirmer & Meisel, 2004). Ein weiteres Problem besteht darin, dass größere Moleküle, wie beispielsweise Oligopeptide, die hochvernetzte Polymermatrix nicht durchdringen und daraus folgend die Bindungskavitäten nicht erreichen können (Ye & Mosbach, 2001; Cormack & Elorza, 2004). Deshalb entwickelten Titirici et al. (2003) die Methode der hierarchischen Prägung, bei der Polymerpartikel resultieren, bei denen die Bindungskavitäten, die mit der N- oder C-terminalen Sequenz des Zielpeptides geprägt wurden, an der Oberfläche lokalisiert sind (Abschnitt 2.1.6.2.2.). Folglich zeigen diese eine Selektivität gegenüber der geprägten Sequenz sowie gegenüber anderen strukturverwandten Dipeptiden und größeren Peptiden, welche die gleiche Epitope aufweisen.

Kempe (2000) synthetisierte verschiedene mit Z-Oxytocin geprägte Bulk-Polymere und stellte bei Wiederbindungsuntersuchungen in Acetonitril, das 5% Essigsäure enthielt, fest, dass das mit dem Quervernetzer TRIM copolymerisierte Polymer eine höhere selektive Bindung gegenüber dem Zielanalyten aufwies als das mit EDMA copolymerisierte Polymer. Dass MIPs, die mit TRIM synthetisiert werden, eine höhere Selektivität gegenüber verschiedenen Peptiden im Vergleich zu mit EDMA synthetisierten Polymeren aufweisen, beobachteten auch Kempe und Mosbach (1996) in ihren früheren Untersuchungen. Rachkov und Minoura (2000; 2001) synthetisierten ebenfalls ein auf MAA und EDMA basierendes Bulk-Polymer zur Wiedererkennung des Peptidhormons Oxytocin, wobei entsprechend der Epitop-Strategie als Templat das N-terminale Ende des Zielmoleküls diente. Die Ergebnisse zeigten, dass im wässrigen Milieu die Retention des Oxytocins auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen basiert. Rachkov et al. (2004) bestätigte die essentielle Rolle der ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Zielanalyten und dem MIP unter wässrigen Elutionsbedingungen, da die Retention des Peptides [Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup>]Angiotensin II auf dem

entsprechend geprägten Polymer in einer wässrigen mobilen Phase eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert aufwies. Es konnte eine gute Selektivität und Retention für das Oktapeptid in wässriger mobiler Phasen beobachtet werden. Das strukturähnliche Peptidhormon Angiotensin II wurde dagegen kaum reteniert. Hart und Shea (2002) entwickelten ein MIP, das zur Wiedererkennung von Peptiden im wässrigen Medium geeignet ist. Für die Polymersynthese, die in Wasser erfolgte, wurde der wasserlösliche Quervernetzer N,N'-Ethylenbisacrylamid sowie ein polymerisierbarer NTA-Ligand, über den Nickel-Ionen in das Polymer eingebaut wurden, eingesetzt. Der Ni-NTA-Komplex, der eine starke Histidin-Bindungsstelle liefert, ist jedoch nur für Peptide geeignet, die am N-Terminus einen Histidin-Rest tragen. Weitere Literaturbeispiele, die Peptid geprägte Bulk-Polymere als stationäre Phase in einer HPLC einsetzten, um die jeweiligen Zielpeptide in einer apolaren organischen mobilen Phase, wie beispielsweise Chloroform oder Acetonitril, zu separieren, sind Ramström et al. (1994), Nicholls et al. (1995), Kempe und Mosbach (1995), Andersson et al. (1996) und Kempe (1996). Yano et al. (1997) synthetisierte das Peptid selektive Polymer mittels einer Fällungs-Polymerisation. Andersson et al. (1995) untersuchte die Bindungsstärke gegenüber dem Zielpeptid Leu-Enkephalin-Anilid mittels eines radioaktiven Ligandenbindungstests.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Chemikalien

Zur Herstellung aller Lösungen sowie zur Durchführung aller übrigen Arbeiten wurde ausschließlich durch mehrfachen Ionenaustausch demineralisiertes und membrangefiltertes Wasser verwendet (Seralpur PRO 90 C; Seral Druck GmbH).

##### 3.1.1.1. Chemikalien zur Synthese

(3-Aminopropyl)triethoxysilan	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (A3648)
Ammoniumcarbonat	–	Fluka Chemie GmbH; (0968)
Ammoniumhydrogendifluorid	–	Fluka Chemie GmbH; (09835)
$\alpha,\alpha'$ -Azoisobutyronitril	–	Fluka Chemie GmbH; (11630)
(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrol- idinophosphonimhexafluorophosphat	–	Fluka Chemie GmbH; (12805)
Chloramphenicol	–	Dr. Ehrenstorfer GmbH; (C11120000)
Chloroform	–	Merck KGaA; (102445)
Dichlormethan	–	Fluka Chemie GmbH; (66740)
Dichlormethan (wasserfrei)	–	Fluka Chemie GmbH; (66749)
2-(Diethylamino)ethylmethacrylat	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (408980)
N,N-Diisopropylethylamin	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (550043)
N,N-Dimethylformamid	–	Fluka Chemie GmbH; (40250)
N,N-Dimethylformamid (wasserfrei)	–	Fluka Chemie GmbH; (40248)
Ethylenglykoldimethacrylat	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (335681)
Fmoc-Ala-OH	–	Novabiochem; (04-12-1006)
Fmoc-Ala-Gly-OH	–	Bachem AG; (B-1895)
Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	–	Novabiochem; (04-12-1085)
Fmoc-Val-OH	–	Novabiochem; (04-12-1039)
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan	–	Merck KGaA; (804324)
1-Hydroxybenzotriazol	–	Fluka Chemie GmbH; (54802)
Magnesiumsulfat	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (M7506)



Methacrylsäure	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (395374)
Methanol	–	Merck KGaA; (106007)
Natriumhydroxid	–	Merck KGaA; (106498)
Piperidin	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (571261)
di-Phosphorpentoxid	–	Merck KGaA; (100540)
Salzsäure	–	Merck KGaA; (100317)
SilicaBond Amine	–	SiliCycle; (R52030B)
Toluol (wasserfrei)	–	Fluka Chemie GmbH; (89677)
2-Vinylpyridin	–	Fluka Chemie GmbH; (95040)

#### 3.1.1.2. Chemikalien zur Analyse

Acetonitril	–	Merck KGaA; (100030)
Ethylacetat	–	Merck KGaA; (100868)
Methanol	–	Merck KGaA; (106007)
Natriumchlorid	–	Merck KGaA; (106404)
Perchlorsäure	–	Merck KGaA; (100518)
Salzsäure	–	Merck KGaA; (100317)
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat	–	Merck KGaA; (800691)
Trichloressigsäure	–	Merck KGaA; (100807)
Trifluoressigsäure	–	Merck KGaA; (108262)
Wolframatophosphorsäure	–	Merck KGaA; (100582)
Chloramphenicol	–	Dr. Ehrenstorfer GmbH; (C11120000)
Chloramphenicol-d <sub>5</sub>	–	Cambridge Isotope Labor Inc.; (FSD-079-100)
H-Ala-OH	–	Novabiochem; (04-10-0001)
H-Ala-Gly-OH	–	Bachem AG; (G-1215)
H-Ala-Lys-OH	–	Bachem AG; (G-1290)
Florfenicol	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (F1427)
Fmoc-Ala-OH	–	Novabiochem; (04-12-1006)
Fmoc-Ala-Gly-OH	–	Bachem AG; (B-1895)
H-Lys-OH	–	Novabiochem; (04-10-0024)
H-Lys-Ala-OH	–	Bachem AG; (G-2630)

Nisin (92%)	–	Danisco; (Geschenk)
Thiamphenicol	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; (TO261)

#### 3.1.2. Geräte

##### 3.1.2.1. Geräte allgemein

Analysenwaage Typ PM 4600 Delta Range	–	Mettler Waagen GmbH
Kolbenhubpipetten (variabel) (20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl)	–	Eppendorf AG
Messpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	–	Brand GmbH & Co. KG
Minishaker Typ MS2	–	IKA Werke GmbH & Co. KG
Wasserbad GFL Typ 1013	–	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Wasserstrahlpumpe	–	Brand GmbH & Co. KG
Ultraschallbad Senorex Super, Typ RK 510H	–	Bandelin electronic GmbH & Co. KG

##### 3.1.2.2. Geräte zur Synthese

Analysensieb (< 25 µm, < 50 µm)	–	Retsch GmbH & Co. KG
Destillierbrücke mit Liebigkühler (250 mm)	–	Schott Duran GmbH & Co. KG
Dreihalsrundkolben (250 ml)	–	Schott Duran GmbH & Co. KG
Extraktionsaufsatz nach Soxhlet (100 ml)	–	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG
Extraktionshülsen (16 x 50 mm)	–	Schleicher & Schuell GmbH
Filternutsche (Porosität 4, 75 ml)	–	Robu Glasfilter-Geräte GmbH
Hochvakuumpumpe SASKIA RBF018	–	Labovac GmbH
Magnetrührer IKA-Combimag Typ RCT	–	IKA Werke GmbH & Co. KG
Mörsermühle RM100	–	Retsch GmbH & Co. KG
PFA-Rundkolben (250 ml)	–	Vitlab GmbH
Rundkolben (50 ml, 250 ml, 500 ml)	–	Schott Duran GmbH & Co. KG
Rüttler KS250 basic	–	IKA Werke GmbH & Co. KG
Scheidetrichter (500 ml, konisch)	–	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG

### 3. Material und Methoden

---

Schlangenkühler (250 mm)	–	Schott Duran GmbH & Co. KG
Szintillations-Fläschchen (20 ml) mit Schraubdeckel	–	Wheaton Science Products Inc.
Tropfenfänger nach Stutzer	–	Schott Duran GmbH & Co. KG
Tropftrichter (100 ml)	–	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG
Übergangsstück mit Olive und Hahn	–	Schott Duran GmbH & Co. KG

#### 3.1.2.3. Geräte zur Analyse

Concentrator 5301 mit Membran-Vakuumpumpe	–	Eppendorf AG
Hitachi-Pumpe 655A-12 Liquid Chromatograph	–	Merck KGaA
Kartuschen Isolute-G(XL) (10 ml)	–	Separtis GmbH
Leersäule komplett (60 x 4,6 mm ID)	–	CS-Chromatographie Service GmbH
Polyethylen-Fritten (10 µm)	–	Separtis GmbH
Probenfläschchen (12x32 mm, 1,5 ml, klar) mit Schraubkappe (Silikon/PTFE-Septum)	–	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Superspher®100 RP-18 endcapped (125 x 4 mm ID)	–	Merck KGaA
Visiprep SPE Vacuum Manifold	–	Sigma-Aldrich, Supelco
Zentrifugenröhrchen (PTFE, 10 ml)	–	Nalge Nunc International
Zentrifuge RC-28S Supraspeed Centrifuge	–	Du Pont Company, Sorvall Products
Auswertesoftware	–	Thermo Quest Inc.
ChromQuest Chromatography Workstation		
Autosampler AS 3000	–	Thermo Separation Products Inc.
Detektor UV 6000 LP	–	Thermo Separation Products Inc.
HPLC Pumpe P4000	–	Thermo Separation Products Inc.
Aluminium-Standard-Stiftprobentellern (Ø 12 mm)	–	Plano GmbH
Haftaufkleber Leit-Tabs (doppelseitig klebend, leitfähig, Ø 12 mm)	–	Plano GmbH
Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage MED020	–	Bal-Tec AG

Quarz-Schichtdickenmessgerät QSG 100	–	Bal-Tec AG
Rasterelektronenmikroskop XL30	–	FEI Company

#### 3.1.2.4. Geräte zur Analyse bei der Firma applica GmbH

Bakerbond <sup>®</sup> Octadecyl C(18) 40 µm Prep	–	J.T.Baker Inc.
Bakerbond spe <sup>™</sup> Amino(NH <sub>2</sub> ) Disposable Extraction Columns	–	J.T.Baker Inc.
Laborzentrifuge Heraeus biofuge pico	–	Heraeus GmbH
Laborzentrifuge Heraeus biofuge primo	–	Heraeus GmbH
Mikrofilter (Cellulose, 0,45 µm, 13 mm Ø)	–	Teknokroma
Präzisionswaage Toledo AG 245	–	Mettler Waagen GmbH
Schütteltisch IKA VIBRAX-VXR	–	IKA Werke GmbH & Co. KG
TCS-Trockentemperiersystem	–	Barkey GmbH & Co. KG
Auswertesoftware ThermoFinnigan Xcalibur	–	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Autosampler ThermoFinnigan Surveyor	–	Thermo Fisher Scientific, Inc.
LC-Pumpe ThermoFinnigan Surveyor	–	Thermo Fisher Scientific, Inc.
LC-Trennsäule Thermo BDS Hypersil C18 (125 x 2,1 mm ID, 5 µm)	–	Thermo Fisher Scientific, Inc.
MS/MS Finnigan TSQ Quantum Discovery	–	Thermo Fisher Scientific, Inc.
online-Festphasenextraktion APPLICA SP2000	–	Applica GmbH

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Chemikalienaufreinigung

Bevor MAA, EDMA und AIBN zur Polymersynthese eingesetzt wurden, wurden diese zur Entfernung von Inhibitoren und sonstigen Begleitstoffen wie folgt aufgereinigt. 150 ml MAA wurden unter reduziertem Druck (20 mbar) bei 85°C destilliert. 350 ml EDMA wurden in

einem Scheidetrichter mit 150 ml 10%iger NaOH-Lösung durch kräftiges Schütteln für 1 min sechs mal extrahiert. Danach wurde in einem Scheidetrichter fünf mal mit 150 ml 2,5%iger  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat im Exsikkator getrocknet. Abschließend wurde das extrahierte, gewaschene und getrocknete EDMA ebenfalls unter reduziertem Druck (20 mbar) bei 160°C destilliert. Zur Destillation der Monomere diente eine Destillierbrücke mit Liebigkühler, die mit 250 ml Rundkolben und einem Tropfenfänger ausgestattet war, ein temperiertes Ölbad sowie eine Hochvakuumpumpe. Der Initiator wurde durch Umkristallisation aufgereinigt, wofür 10 g AIBN und 60 ml Methanol in einen 250 ml Rundkolben, der mit einem Schlangenkühler ausgestattet war, gegeben wurden. Mittels eines auf 100°C temperierten Ölbad wurde Methanol so lange zum Sieden gebracht, bis sich AIBN vollständig gelöst hatte. Damit AIBN wieder auskristallisieren konnte, wurde die Lösung zuerst langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend für 12 h bei -24°C stehen gelassen. Zum Schluss wurde das umkristallisierte AIBN über eine Nutsche abfiltriert, mit 50 ml Methanol gewaschen sowie im Exsikkator getrocknet. Das von Inhibitoren befreite MAA, EDMA und AIBN wurden bis zur Verwendung bei -24°C gelagert.

#### 3.2.2. Bulk-Polymerisation

0,42 mmol des Templats wurden mit 5 mmol des funktionellen Monomers in einem luftdicht verschraubbaren Glasgefäß vermischt. Das molare Verhältnis vom Templat zum funktionellen Monomer betrug 1:12. Nach 5-minütiger Standzeit wurden 4,624 ml (24,5 mmol) EDMA, 48,4 mg (0,295 mmol) AIBN sowie 7 ml Chloroform hinzugefügt. Somit betrug das molare Verhältnis vom funktionellen Monomer zum Quervernetzer 17:83. Die Menge des Initiators entsprach 1 mol% der Gesamtmenge an polymerisierbaren Monomeren. Zur Entfernung von gelöstem Sauerstoff wurde das Präpolymer für 5 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend 5 min mit Stickstoff durchspült. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C für 24 h in einem Wasserbad. Der resultierende Polymerblock wurde nach Beendigung der Polymerisation 10 min mechanisch in einer Mörsermühle gemahlen. Die erhaltenen Polymerpartikel wurden mit Wasser zuerst über ein Analysensieb mit einer Maschenweite von 50 µm und anschließend über ein Analysensieb mit einer Maschenweite von 25 µm gesiebt. Die Partikelfraktion mit einem Durchmesser kleiner 25 µm wurde gesammelt. Um

Partikel, die einen Durchmesser kleiner 3  $\mu\text{m}$  aufwiesen, aus der Fraktion zu entfernen, wurde mehrmals mit 50 ml Acetonitril dekantiert bis der Überstand annähernd klar war. Die Standzeit betrug 20 min. Zum Schluss wurde das Templat durch Soxhlet-Extraktion für 6 h mit 200 ml Methanol aus der Polymermatrix entfernt, wobei das Polymer sich in einer Extraktionshülse befand und die Wasserbadtemperatur 90°C betrug. Die Synthese der NIPs erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den MIPs mit dem Unterschied, dass zum Präpolymer kein Templat hinzugefügt wurde, so dass es unter Abwesenheit des Templats polymerisierte.

Die Tabelle 3-1 zeigt die mittels Bulk-Polymerisation hergestellten Polymere sowie für deren Synthese eingesetzten Mengen an Templat und funktionellen Monomer.

Tab. 3-1: Synthetisierte Bulk-Polymere

Polymer	Templat	funktionelles Monomer
<b>P(CAP_DEAEMA)</b>	135,7 mg CAP	843 $\mu\text{l}$ DEAEMA
<b>P(DEAEMA)</b>	–	843 $\mu\text{l}$ DEAEMA
<b>P(CAP_MAA)</b>	135,7 mg CAP	424 $\mu\text{l}$ MAA
<b>P(MAA)</b>	–	424 $\mu\text{l}$ MAA
<b>P(CAP_2VPy)</b>	135,7 mg CAP	539 $\mu\text{l}$ 2VPy
<b>P(FF_2VPy)</b>	150,4 mg FF	539 $\mu\text{l}$ 2VPy
<b>P(TAP_2VPy)</b>	149,6 mg TAP	539 $\mu\text{l}$ 2VPy
<b>P(2VPy)</b>	–	539 $\mu\text{l}$ 2VPy

#### 3.2.3. Hierarchische Prägung

Die im folgenden Abschnitt dargestellte Methode zur Synthese von hierarchisch geprägten Polymeren basiert auf den Arbeiten von Titirici et al. (2002), Titirici et al. (2003) sowie Titirici und Sellergren (2004).

#### 3.2.3.1. Einbringung von Aminogruppen auf die Silicageloberfläche

Die unter diesem Abschnitt 3.2.3.1. beschriebenen Synthesen und Untersuchungen erfolgten durch den Arbeitskreis Sellergren am Institut für Umweltforschung (INFU) an der Universität Dortmund.

##### – Aktivierung der Silicageloberfläche

Durch Aktivierung des Silicagels mit 17%iger Salzsäure wurden Hydroxylgruppen auf die Silicageloberfläche gebracht (Si-OH). Dafür wurden in einen 500 ml Rundkolben, der mit einem Kondensator ausgestattet war, 300 ml 17%ige Salzsäure sowie 20 g des Silicagels in kleinen Portionen unter ständigem Rühren gegeben. Das verwendete Silicagel wurde vom Arbeitskreis Sellergren am Institut für Umweltforschung an der Universität Dortmund zur Verfügung gestellt. Die Reaktion erfolgte bei 150°C. Nach Ablauf von 24 h wurde das Silicagel abfiltriert, mit 300 ml Methanol gewaschen und in einem Vakuumofen bei 80°C für 4 h und bei 150°C für 12 h getrocknet.

##### – Modifizierung der Silicageloberfläche

Durch die Modifikation der Hydroxylgruppen mit APS wurden Aminogruppen auf die Silicageloberfläche gebracht (Si-NH<sub>2</sub>). Dafür wurden in einen 250 ml Dreihalsrundkolben, der mit einem Kondensator ausgestattet war, 6 g des rehydroxilierten Silicagels, das in 80 ml wasserfreiem Toluol suspendiert war, sowie die zu der Menge an Silanolgruppen auf der Silicageloberfläche (8 µmol/m<sup>2</sup>) entsprechende Menge an APS (16,8 mmol, 3,73 g) gegeben. Dieses Gemisch reagierte unter ständigem Rühren und Stickstoffatmosphäre über Nacht bei 110°C. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Silicagel abfiltriert, mit 100 ml Toluol und 100 ml Methanol gewaschen sowie in einem Vakuumofen bei 40°C für 24 h getrocknet.

##### – Entkappung

Beim Entkappen wurden alle Hydroxylgruppen, die nicht mit APS modifiziert wurden, wieder entfernt. Dafür wurden in einen 250 ml Dreihalsrundkolben, der mit einem Kondensator und einem Tropftrichter ausgestattet war, 5 g des APS-modifizierten Silicagels, das in 60 ml wasserfreiem Dichlormethan suspendiert war, gegeben. Danach wurde 1 ml HMDS, das in 20 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst war, tropfenweise zu der Suspension hinzugefügt. Das Gemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für 24 h gerührt und im Anschluss nochmals für 3 h kondensiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Silicagel

abfiltriert, mit 50 ml Methanol gewaschen, um unreaktiertes HMDS zu entfernen und in einem Vakuumofen bei 40°C für 24 h getrocknet.

#### – Berechnung der Ladungsdichte

Um die Ladungsdichte der Aminogruppen auf der Silicageloberfläche, wie nachstehend dargestellt, berechnen zu können, wurde der Stickstoff-Gehalt des APS-modifizierten und entkappten Silicagels mittels Elementaranalyse sowie die Oberfläche des Silicagels mittels Stickstoffsorptionsmessung bestimmt.

$$D_s = \frac{m_N}{M_N \times S}$$

$D_s$  = Ladungsdichte

$S$  = Oberfläche des Silicagels

$M_N$  = Molekulargewicht Stickstoff

$$m_N = \frac{\Delta N\%}{100 - \frac{\Delta N\% \times M_W}{M_N}}$$

$M_W$  = Molekulargewicht APS

$\Delta N\%$  =  $\%N_{\text{nach Endkappung}} - \%N_{\text{vor Aktivierung}}$

#### 3.2.3.2. Immobilisation Fmoc-geschützter Aminosäuren oder Peptide an die Silicagel-Amin-Oberfläche

Die Immobilisation der Fmoc-geschützten Aminosäure bzw. des Fmoc-geschützten Peptides an die Silicagel-Amin-Oberfläche erfolgte in einem 250 ml Dreihalsrundkolben, der mit einem Tropftrichter ausgestattet war. In den Dreihalsrundkolben wurde über den Tropftrichter wasserfreies N,N-Dimethylformamid sowie die Fmoc-geschützte Aminosäure bzw. das Fmoc-geschützte Peptid, PyBOP, HOBt und DIPEA unter Rühren mittels eines Magnetrührers, bei Raumtemperatur und unter Stickstoffatmosphäre gegeben. Nach Ablauf einer 15-minütigen Reaktionszeit wurde das Silicagel-Amin hinzugefügt. Die eingesetzten molaren Mengen der einzelnen Reaktionskomponenten pro Gramm Silicagel entsprachen der molaren Ladungsdichte der Aminogruppen an der Silicageloberfläche (siehe Tab. 3-2 und Tab. 3-3). Die Suspension wurde bei Raumtemperatur sowie unter Stickstoffatmosphäre für 24 h gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Si-AS-Fmoc bzw. Si-Peptid-Fmoc über eine Nutsche abfiltriert, mit 300 ml N,N-Dimethylformamid und 100 ml Methanol gewaschen sowie über di-Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet.



#### 3.2.3.3. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte in einem 250 ml Einhalsrundkolben, in den das Fmoc-AS-Si bzw. Fmoc-Peptid-Si sowie 20%iges Piperidin in N,N-Dimethylformamid gegeben wurden. Es wurden je 3 g Fmoc-AS-Si bzw. Fmoc-Peptid-Si 50 ml der Piperidin-Lösung eingesetzt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 4 h auf einem Rüttler bei 500 Mot/min geschüttelt. Nach Beendigung der Reaktion wurde das AS-Si bzw. Peptid-Si über eine Nutsche abfiltriert, mit 300 ml N,N-Dimethylformamid, 300 ml Dichlormethan und 100 ml Methanol gewaschen sowie über di-Phosphorpentoxid im Exsikkator getrocknet. Nach diesem Schritt folgte entweder die Immobilisation einer weiteren Fmoc-geschützten Aminosäure bzw. Fmoc-geschützten Peptides (Abschnitt 3.2.3.2.) oder die Polymerisation in den Aminosäure- bzw. Peptid-modifizierten Silicagelporen (Abschnitt 3.2.3.4.).

#### 3.2.3.4. Polymerisation in den Silicagelporen

Das Präpolymer bestand aus 424  $\mu$ l (5 mmol) MAA, 4,624 ml (24,5 mmol) EDMA und 48 mg (0,295 mmol) AIBN, so dass das molare Verhältnis vom funktionellen Monomer zum Quervernetzer 17:83 betrug und die Menge des Initiators 1 mol% der Gesamtmenge an polymerisierbaren Monomeren entsprach. Zur Entfernung von gelöstem Sauerstoff wurde das Präpolymer für 5 min ins Ultraschallbad gestellt und anschließend 5 min mit Stickstoff durchspült. Das Präpolymer wurde zum Silicagel, das sich in einem 50 ml Einhalsrundkolben befand, hinzugefügt und mit einem Spatel vorsichtig vermischt. Das eingesetzte Volumen des Präpolymers entsprach 85% des Porenvolumens des Silicagels (siehe Tab. 3-4). Damit das Präpolymer in die Poren des Silicagels eintrat, wurde 5 mal hintereinander für jeweils 10 min ein Stickstoff- und ein Vakuum-Zyklus angewendet. Die Polymerisation erfolgte bei 60°C für 24 h in einem Wasserbad.

#### 3.2.3.5. Herauslösen des Silicagels aus dem Silicagel/Polymer-Gemisch

Das Herauslösen des Silicagels erfolgte in einem 250 ml PFA-Einhalsrundkolben, in den das Silicagel/Polymer-Gemisch sowie 3 mol/l  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ -Lösung gegeben wurden. Es wurden je 3 g Silicagel/Polymer-Gemisch 50 ml der  $\text{NH}_4\text{HF}_2$ -Lösung eingesetzt. Die Suspension wurde bei

Raumtemperatur für 24 h auf einem Rüttler bei 500 Mot/min geschüttelt. Danach wurden die hierarchisch geprägten Polymerpartikel über eine Nutsche abfiltriert, mit 300 ml bidestilliertem Wasser und 200 ml Methanol gewaschen sowie über di-Phosphorpentoxid in einem Exsikkator getrocknet. Abschließend wurden die Templatreste durch Soxhlet-Extraktion für 6 h mit 200 ml Methanol von der Polymeroberfläche entfernt, wobei das Polymer sich in einer Extraktionshülse befand und die Wasserbadtemperatur 90°C betrug.

#### 3.2.3.6. Synthetisierte hierarchisch geprägte Polymere

In der Tabelle 3-2 sind die Eigenschaften der verwendeten Silicagele aufgeführt.

Tab. 3-2: Eigenschaften der verwendeten Silicagele

	Silicagel	Oberfläche	Porenvolumen	Ladungsdichte NH <sub>2</sub> -Gruppen
Silicagel A *	SilicaBond Amine	500 m <sup>2</sup> /g	0,47 ml/g	1,6 mmol/g (3,2 µmol/m <sup>2</sup> )
Silicagel B	vom AK Sellergren zur Verfügung gestellt (INFU Dortmund)	350 m <sup>2</sup> /g	1,08 ml/g	1,3 mmol/g (3,7 µmol/m <sup>2</sup> )

\* Auf die unter Abschnitt 3.2.3.1. beschriebenen Syntheseschritte konnte verzichtet werden, da dieses Silicagel in funktionalisierter Form kommerziell erhältlich ist.

Die zur Immobilisation der Aminosäuresequenz an die Silicagel-Amin-Oberfläche verwendeten Mengen an Silicagel, Fmoc-geschützten Aminosäuren bzw. Peptiden und Chemikalien sind in der Tabelle 3-3 aufgelistet (Abschnitt 3.2.3.2.).

Tab. 3-3: Verwendete Chemikalien zur Immobilisation der Aminosäuresequenz an die Silicagel-Amin-Oberfläche

Polymer	Silicagel ‡	immobilisierte Fmoc-AS bzw. -Peptid 1. – 3. Immobilisation	Chemikalien
<b>P(–)</b>	3 g Silicagel A	1.) –	2,50 g (4,8 mmol) PyBOB 0,69 g (4,8 mmol) HOBt 0,84 ml (4,8 mmol) DIPEA 50 ml DMF (wasserfrei)
<b>P(Lys)</b> P(Fmoc-Lys(Fmoc))*	6 g Silicagel A	1.) 5,67 g (9,6 mmol) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	5,00 g (9,6 mmol) PyBOB 1,37 g (9,6 mmol) HOBt 1,67 ml (9,6 mmol) DIPEA 100 ml DMF (wasserfrei)
<b>P(Lys-Ala)</b> P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala)*	6 g Silicagel A	1.) 3,00 g (9,6 mmol) Fmoc-Ala-OH 2.) 5,67 g (9,6 mmol) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	5,00 g (9,6 mmol) PyBOB 1,37 g (9,6 mmol) HOBt 1,67 ml (9,6 mmol) DIPEA 100 ml DMF (wasserfrei)
<b>P(Lys-Ala-Val)</b> <b>P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val)</b>	6 g Silicagel A	1.) 3,26 g (9,6 mmol) Fmoc-Val-OH 2.) 3,00 g (9,6 mmol) Fmoc-Ala-OH 3.) 5,67 g (9,6 mmol) Fmoc-Lys(Fmoc)-OH	5,00 g (9,6 mmol) PyBOB 1,37 g (9,6 mmol) HOBt 1,67 ml (9,6 mmol) DIPEA 100 ml DMF (wasserfrei)
<b>P<sub>B</sub>(–)</b>	3 g Silicagel B	1.) –	2,03 g (3,9 mmol) PyBOB 0,56 g (3,9 mmol) HOBt 0,68 ml (3,9 mmol) DIPEA 50 ml DMF (wasserfrei)
<b>P<sub>B</sub>(Ala-Gly)</b> <b>P<sub>B</sub>(Fmoc-Ala-Gly)</b>	6 g Silicagel B	1.) 2,85 g (7,8 mmol) Fmoc-Ala-Gly-OH	4,06 g (7,8 mmol) PyBOB 1,11 g (7,8 mmol) HOBt 1,36 ml (7,8 mmol) DIPEA 100 ml DMF (wasserfrei)

‡ Silicagel A = SilicaBond Amine (SiliCycle); Silicagel B = vom AK Selligren zur Verfügung gestellt (INFU Dortmund); (siehe Tab. 3-2)

\* Polymerpartikel haben sich während des HerauslöSENS des Silicagels aus dem Silicagel/Polymer-Gemisch ebenfalls aufgelöst, so dass kein verwendbares Polymer erhalten werden konnte (Abschnitt 3.2.3.5.)

Nachdem die gewünschte Aminosäuresequenz an die Silicageloberfläche immobilisiert wurde, wurde das Silicagel auf zwei gleichgroße Mengen aufgeteilt. Die immobilisierten Aminosäuren bzw. Peptide waren nach diesem Schritt noch Fmoc-geschützt. Die immobilisierten Fmoc-geschützten Aminosäuren bzw. Peptide der ersten Teilmenge, die ungefähr 3 g umfasste, wurde mit einer 20%igen Piperidin-Lösung entschützt (Abschnitt 3.2.3.3.). Erst danach wurde das Präpolymer hinzugefügt, so dass Polymere resultierten, die mit nicht Fmoc-geschützten Aminosäuren oder Peptiden hierarchisch geprägt waren (Abschnitt 3.2.3.4.). Zu der zweiten Silicagelteilmenge, die ebenfalls ungefähr 3 g umfasste, wurde im direkten Anschluss an den Immobilisationsschritt das Präpolymer hinzugefügt.

Daher resultierten aus diesen modifizierten Silicagelen Polymere, die mit Fmoc-geschützten Aminosäuren oder Peptiden hierarchisch geprägt waren.

In der Tabelle 3-4 sind die Volumina des Präpolymers, die zu den Aminosäure- und Peptid-modifizierten Silicagelen hinzugefügt wurden, aufgelistet (Abschnitt 3.2.3.4.). Die Volumenberechnung erfolgte mit der nachstehenden Formel, wobei das Volumen des Präpolymers 85% des Silicagelporenvolumens entsprechen muss. Somit betrug der Umrechnungsfaktor 0,85.

$$V_{\text{Präpolymer}} \text{ (ml/g Silicagel)} = V_{\text{Silicagelporen}} \text{ (ml/g Silicagel)} \times 0,85$$

Tab. 3-4: Volumina des Präpolymers

Polymer	AS-/Peptid-modif. Silicagel	Volumen Präpolymer
<b>P( – )</b>	2,92 g	1,17 ml (1,22 g)
<b>P(Lys)</b>	3,04 g	1,21 ml (1,28 g)
<b>P(Lys-Ala)</b>	2,93 g	1,17 ml (1,23 g)
<b>P(Lys-Ala-Val)</b>	2,89 g	1,15 ml (1,21 g)
<b>P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val)</b>	2,82 g	1,13 ml (1,18 g)
<hr/>		
<b>P<sub>B</sub>( – )</b>	2,85 g	2,62 ml (2,75 g)
<b>P<sub>B</sub>(Ala-Gly)</b>	2,90 g	2,66 ml (2,80 g)
<b>P<sub>B</sub>(Fmoc-Ala-Gly)</b>	2,91 g	2,67 ml (2,80 g)

#### 3.2.3.7. Elementaranalyse

Die Mikroelementaranalyse von Kohlenstoff und Stickstoff der Nisin C-terminal analog hierarchisch geprägten Polymere wurde vom Mikroanalytischen Labor Pascher (Remagen-Bandorf) durchgeführt. Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalte der Polymere P<sub>B</sub>( – ), P<sub>B</sub>(Ala-Gly) und P<sub>B</sub>(Fmoc-Ala-Gly) erfolgte unter Verwendung eines Heraeus-CHN-Rapid-Analysators (Heraeus GmbH) durch den Arbeitskreis Sellergren am Institut für Umweltforschung an der Universität Dortmund.

#### 3.2.4. HPLC-Analysen

Die HPLC-Analysen erfolgten bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Säulentemperatur von 30°C. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Die Detektion der Zielanalyten erfolgte bei den jeweiligen Absorptionsmaxima. Daher wurde Chloramphenicol bei 275 nm, Thiamphenicol sowie Florfenicol bei 225 nm und Nisin sowie die verschiedenen Aminosäuren und Peptide bei 205 nm detektiert.

##### 3.2.4.1. Chromatographische Evaluierung

Zur chromatographischen Evaluierung wurden die Polymere in einer Acetonitril/Wasser-Mischung (70:30; v/v) suspendiert und in leere Edelstahlsäulen gepackt. Beim Packlaufmittel handelte es sich ebenfalls um eine Acetonitril/Wasser-Mischung (70:30; v/v). Es wurde ein Packdruck von 200 bar angestrebt, der jedoch nicht für alle Polymere erreicht werden konnte, so dass mit der maximal möglichen Fußrate der verwendeten Pumpe von 10 ml/min gepackt wurde. Die Packdauer betrug 10 min.

Die chromatographische Evaluierung der Polymere erfolgte im isokratischen Modus. Nach Wechsel der mobilen Phase wurde die mit Polymer gepackte Säule 30 min mit der neuen mobilen Phase equilibriert, so dass eine stabile Basislinie vorlag. Die aufgebrauchten Konzentrationen der Zielanalyten betrugen entsprechend ihrer Fähigkeit zur UV-Absorption:

- 1 µmol/ml – Chloramphenicol, Florfenicol, Thiamphenicol, Lys-Ala, Ala-Lys, Ala-Gly
- 10 µmol/ml – Lysin, Alanin
- 0,1 µmol/ml – Nisin, Fmoc-Ala-Gly, Fmoc-Ala.

Auf Grund der begrenzten Kapazität eines MIPs, den Zielanalyten spezifisch zu binden, wurde für die Analyten Chloramphenicol, Florfenicol und Thiamphenicol zusätzlich die Konzentration 0,1 µmol/ml analysiert. Zur Bewertung der Retentionszeiten wurden der Retentionsfaktor, Prägungsfaktor und Separationsfaktor wie folgt berechnet, wobei für den Prägungs- und Separationsfaktor der Absolutwert verwendet wurde:

$$K = \frac{t_1 - t_0}{t_0}$$

K = Retentionsfaktor

t<sub>1</sub> = Retentionszeit Zielmolekül

t<sub>0</sub> = Retentionszeit Aceton

$$IF = \frac{K_{MIP}}{K_{NIP}}$$

IF = Prägungsfaktor

K<sub>MIP</sub> = Retentionsfaktor des Analyten auf dem MIP

K<sub>NIP</sub> = Retentionsfaktor des Analyten auf dem NIP

$$\alpha = \frac{K_1}{K_2}$$

α = Separationsfaktor

K<sub>1</sub> = Retentionsfaktor des Zielmoleküls

K<sub>2</sub> = Retentionsfaktor eines anderen Analyten

#### 3.2.4.2. Bestimmung der Wiederfindung nach Festphasenextraktion

Die Analysen der Eluate, die nach Festphasenextraktion erhalten wurden, wurden auf einer RP18-Säule durchgeführt. Chloramphenicol-Lösungen wurden mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung (27,5:72,5; v/v), die 0,1% TFA enthielt, im isokratischen Modus eluiert. Die Elution der Honigproben sowie der Nisin-Lösungen wurden in Gradientenmodi durchgeführt, die in den Tabellen 3-5 und 3-6 dargestellt sind. Dabei entsprach Lösung A Wasser, das 0,1% TFA enthielt, und Lösung B Acetonitril, das 0,1% TFA enthielt.

- Honigprobe: 0,5% – 25,5% Lösung B in 100 min
- Nisin-Lösung: 20% – 30% Lösung B in 20 min

Die Wiederfindungen vom Chloramphenicol bzw. Nisin wurden durch Vergleich der Peakfläche des Analyten mit der Peakfläche eines externen Standards bestimmt (siehe nachstehende Formel).

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{A_{\text{Probe}} \times 100\%}{A_{\text{Standard}}} \times \text{VF}$$

A<sub>Probe</sub> = Peakfläche des Zielanalyten

A<sub>Standard</sub> = Peakfläche des externen Standards

VF = Verdünnungsfaktor

Tab. 3-5: Gradientenprogramm zur HPLC-Trennung der SPE-Eluate von Honigproben

Zeit (min)	AcN + 0,1% TFA (%)	H <sub>2</sub> O + 0,1% TFA (%)
0	0,5	0,5
10	0,5	99,5
110	25,5	74,5
111	25,5	74,5
116	40	60
117	40	60
118	0,5	99,5
130	0,5	99,5

Tab. 3-6: Gradientenprogramm zur HPLC-Trennung der SPE-Eluate von Nisin-Lösungen

Zeit (min)	AcN + 0,1% TFA (%)	H <sub>2</sub> O + 0,1% TFA (%)
0	20	80
5	20	80
25	30	70
28	30	70
29	20	80
40	20	80

Die Chloramphenicol- sowie Nisin-Lösungen zur Erstellung der Standardverdünnungsreihen wurden unter den gleichen HPLC-Bedingungen analysiert wie die Festphasenextraktionseluate der Chloramphenicol- bzw. Nisin-Lösungen. Zur Erstellung der Standardverdünnungsreihen wurden die nachstehenden Konzentrationen analysiert.:

- Chloramphenicol (nmol/ml): 0,1 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 25 ; 35 ; 60 ; 75 ; 100 ; 150 ; 175 ; 225 ; 250 ; 500 ; 750 ; 1000
- Nisin (nmol/ml): 1,5 ; 2 ; 3 ; 4,5 ; 7,5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 30 ; 45 ; 75 ; 150 ; 225 ; 300

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie die lineare Kalibrierung und der Korrelationsfaktor (r) wurden nach DIN 32645 mit der Software VALOO Analytik-Software 1.0 (Dr. Stella Nieto-Ernst, Leer) berechnet. Zusätzlich wurde die Nachweisgrenze anhand des Signal/Rausch-Verhältnisses von 3:1 und die Bestimmungsgrenze anhand des Signal/Rausch-Verhältnisses von 10:1 ermittelt (Kromidas, 1999; S. 179).

#### **3.2.5. Manuelle Festphasenextraktion**

Die manuelle Festphasenextraktion erfolgte bei einer Flussrate von ungefähr 0,5 ml/min. 50 mg oder 100 mg trockenes Polymer wurden zwischen zwei Polyethylen-Fritten in eine 10 ml SPE-Kartusche gepackt. Bevor die Probe auf die Kartusche übergeführt wurde, wurde diese konditioniert, um das Polymer komplett zu befeuchten. Die Lösung zur Konditionierung sowie die Lösung, in der die Probe gelöst war, entsprach der Waschlösung. Nach dem Waschen folgte die Elution, wobei Chloramphenicol mit 3 ml Methanol und Nisin mit 3 ml Methanol + 0,1% HCl eluiert wurde. Zur Analyse mittels RP18-HPLC wurden die Eluate im Konzentrator zur Trockene gebracht und in 200 µl Acetonitril/Wasser (1:3; v/v) aufgenommen. Den Proben, die aus der Festphasenextraktion von Nisin stammten, wurde zur Erniedrigung des pH-Wertes zusätzlich noch 0,1% Salzsäure zugesetzt.

#### **3.2.6. Online-SPE-LC-MS/MS**

Die Untersuchungen mittels online-Festphasenextraktion, die mit einer Flüssigchromatographie und Triple Quadrupole Massenspektrometrie gekoppelt war, erfolgten bei der Firma Applica GmbH in Bremen (siehe auch Grotewahl, 2006).

##### **3.2.6.1. Online-Festphasenextraktion**

Bei der online-Festphasenextraktion wurde als Kartuschenfüllung ein RP18-Material oder ein MIP bzw. NIP verwendet. Die Kartuschendimension betrug 20 x 2 mm. Das Injektionsvolumen umfasste 200 µl. Die Tabelle 3-7 zeigt das verwendete online-SPE-Programm zur Probenaufbereitung.



Tab. 3-7: online-SPE-Programm zur Probenaufbereitung

Schritt	Zeit (min)	Flussrate ml/min	Funktion
0	0	0,4	Konditionierung der Kartusche
1	0,01	0,4	Transfer des Autosampler-Schleifenvolumens auf die Kartusche mit anschließendem Waschschrift
2	4	0,4	Analyten-Transfer auf die LC-Säule
3	8	0,4	Waschen
4	16	0,4	Rekonditionierung

#### 3.2.6.2. LC-Trennsystem

Bei der LC-Trennung betrug die Temperatur der Säule sowie des Autosamplers 25°C. Das Injektionsvolumen umfasste 500 µl. Die Elution wurde bei einer Flussrate von 0,2 ml/min im Gradientenmodus durchgeführt, der in der Tabelle 3-8 dargestellt ist.

Tab. 3-8: Gradientenprogramm zur LC-Trennung

Zeit (min)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
0	90	10
6	90	10
10	50	50
15	25	75
20	90	10
25	90	10

#### 3.2.6.3. Detektion mittels Triple Quadrupole – Massenspektrometer

Zur Detektion des Chloramphenicols mittels Triple Quadrupole Massenspektrometer wurden folgende Einstellungen verwendet:

- Ionisierungsmethode: ESI
- Polarität: negativ
- Kapillartemperatur: 380°C

- Tune-Methode: Optimierung mittels Auto-Tune auf die Masse 321
 

Quelle CID Kollisionsenergie	14 Volt
Kollisionsgasdruck	1,0 mTorr
Kollisionsenergie	17 Volt
Abtastbreite	m/z 0,5
Peakbreite	Q1    0,5 FWHM
	Q3    0,5 FWHM
Abtastzeit	0,1 s
- Sprühkopfstellung: 30° off axis

Die Massendetektion erfolgte im Single-Reaktions-Mode, der in der Tabelle 3-9 dargestellt ist.

Tab. 3-9.: Single-Reaktions-Mode der Massendetektion

	Parent-Mass (m/z)	MS/MS-Produkt-Ionen (m/z)
Chloramphenicol	321 [M-H] <sup>-</sup>	152/176/194/257
	323 [M-H] <sup>-</sup>	152/176/194/257/259
Chloramphenicol-d <sub>5</sub>	326 [M-H] <sup>-</sup>	157/262/180/199
	328 [M-H] <sup>-</sup>	157/262/264/180/199

#### 3.2.6.4. Auswertung

Die Wiederfindungen vom Chloramphenicol bzw. Chloramphenicol-d<sub>5</sub> nach der online-Festphasenextraktion auf einem MIP oder NIP wurden durch Vergleich der Peakfläche des Analyten mit der Peakfläche eines externen Standards bestimmt. Der externe Standard wurde auf dem gleichen online-SPE-LC-MS/MS-System bestimmt, mit dem Unterschied das als SPE-Kartuschenfüllung ein RP18-Material diente.

$$\text{CAP-Wiederfindung (\%)} = \frac{A_{\text{Probe (CAP)}} \times 100\%}{A_{\text{Standard (CAP)}}} \times \text{VF}$$

$$\text{CAPd}_5\text{-Wiederfindung (\%)} = \frac{A_{\text{Probe (CAP-d5)}} \times 100\%}{A_{\text{Standard (CAP-d5)}}} \times \text{VF}$$

$A_{\text{Probe (CAP)}}$	=	Summe der Peakflächen der Massenspuren 321 und 323 in der Probe
$A_{\text{Standard (CAP)}}$	=	Summe der Peakflächen der Massenspuren 321 und 323 im Standard
$A_{\text{Probe (CAP-d5)}}$	=	Summe der Peakflächen der Massenspuren 326 und 328 in der Probe
$A_{\text{Standard (CAP-d5)}}$	=	Summe der Peakflächen der Massenspuren 326 und 328 im Standard
VF	=	Verdünnungsfaktor

#### 3.2.7. Probenaufbereitung

##### 3.2.7.1. Honigprobenaufbereitung zur manuellen Festphasenextraktion

Es wurde 1 ( $\pm 0,05$ ) g des homogenisierten Honigs (Sommerblüten Bienenhonig, Langnese) in ein 10 ml PTFE-Zentrifugenröhrchen eingewogen und in 2 ml 4%iger Natriumchlorid-Lösung gelöst sowie mit 10  $\mu\text{l}$  Chloramphenicol-Lösung (0,5  $\mu\text{mol}$  oder 1  $\mu\text{mol}$  oder 10  $\mu\text{mol}$  CAP / 1 ml AcN) versetzt. Nach Zugabe von 5 ml Ethylacetat wurde durch kräftiges Schütteln für 15 min extrahiert und im Anschluss bis zur Phasentrennung bei 8500  $\text{min}^{-1}$  (10000 x g) 5 min zentrifugiert. Danach wurde die komplette Ethylacetat-Phase abgenommen und bei 45°C im Konzentrator zur Trockene gebracht. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol/Wasser (5:95; v/v); Acetonitril oder Ethylacetat aufgenommen und auf eine SPE-Kartusche übergeführt.

##### 3.2.7.2. Probenaufbereitung zur online-SPE-LC-MS/MS

Die Untersuchungen mittels online-Festphasenextraktion, die mit einer LC-MS/MS gekoppelt war, erfolgten bei der Firma Applica GmbH in Bremen (siehe auch Grotewahl, 2006).

#### – Honig

Es wurde 1 ( $\pm 0,05$ ) g des homogenisierten Honigs (Sammelprobe; Applica GmbH, Bremen) in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 50  $\mu$ l internem Standard (0,1  $\mu$ g CAPd<sub>5</sub> / 1 ml H<sub>2</sub>O) versetzt und in 2 ml 4%iger Natriumchlorid-Lösung gelöst. Nach Zugabe von 5 ml Ethylacetat wurde für 15 min auf einem Schütteltisch extrahiert und im Anschluss bis zur Phasentrennung bei 8500 min<sup>-1</sup> (10015 x g) 5 min zentrifugiert. Danach wurde die komplette Ethylacetat-Phase in ein weiteres 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Stickstoffstrom bei 40°C zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 500  $\mu$ L Wasser/Methanol (90:10; v/v) aufgenommen, mikrofiltriert (0,45  $\mu$ m) und schlussendlich in ein Probenfläschchen überführt.

#### – Propolis

Es wurden 0,25 ( $\pm 0,01$ ) g Propolis (Sammelprobe; Applica GmbH, Bremen) in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 100  $\mu$ L internem Standard (0,1  $\mu$ g CAPd<sub>5</sub> / 1 ml H<sub>2</sub>O) versetzt sowie in 8 ml Methanol gelöst, wofür die Lösung 20 min auf einem Schütteltisch rüttelte. Anschließend wurde die Lösung bis zur Phasentrennung bei 8500 min<sup>-1</sup> (10015 x g) 5 min zentrifugiert. Die Methanolphase wurde mittels einer Einwegspritze abgenommen und mit Hilfe eines Aufsatzes für die manuelle Festphasenextraktion vorsichtig durch eine Bakerbond® NH<sub>2</sub>-Festphasenkartusche gedrückt. Dabei musste beachtet werden, dass die Lösung nur eine leichte Gelbfärbung annimmt. Durchschnittlich wurden drei bis vier Festphasenkartuschen verwendet. Das notwendige Endvolumen der methanolischen Phase von 4 mL wurde in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und im Stickstoffstrom bei 40°C zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde zuerst in 50  $\mu$ L Methanol vollständig gelöst und dann mit 450  $\mu$ l Wasser aufgefüllt. Diese Lösung wurde nach guter Durchmischung bei 13000 min<sup>-1</sup> (16060 x g) 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Mikrofilter (0,45  $\mu$ m) filtriert und in ein Probenfläschchen überführt.

#### **3.2.8. Rasterelektronenmikroskopie**

Bei der Probenpräparation zur REM-Analyse wurde ein doppelseitig klebender leitfähiger Haftaufkleber auf einem Aluminium-Standard-Stiftprobentellern befestigt. Auf diesen Halter wurde in einer dünnen Schicht eine geringe Menge des Polymers aufgestaubt. Anschließend wurde das Polymer in eine Hochvakuum-Kleinbeschichtungsanlage überführt, die mit einem wassergekühlten Gold-Target Wechselflansch-Sputterkopf (Abstand zwischen Proben-tisch und Goldtarget: 5 cm) ausgerüstet war. Nachdem die Anlage evakuiert und der Rezipient mit Argon geflutet (Gasdruck:  $5 \times 10^{-2}$  mbar) war, erfolgte der Sputterprozess für 25 s bei einer Stromstärke von 40 mA. Die Schichtdicke der aufgedampften Goldschicht wurde mit einem Quarz-Schichtdickenmessgerät kontrolliert. Die REM-Analyse wurde im Hochvakuum-Modus („HiVac“) bei einer Beschleunigungsspannung von 5 bis 10 kV mit einem Sekundärelektronen-Detektor durchgeführt. Die digitale Bilddokumentation erfolgte im Standard-TIFF-Format.

### 4. Ergebnisse und Diskussion

Um die Wiedererkennungseigenschaften sowie deren Beeinflussbarkeit beurteilen zu können, wurden alle synthetisierten Polymere chromatographisch mittels HPLC-Analysen evaluiert. Darüber hinaus lieferte die chromatographische Evaluierung wertvolle Informationen für den anschließenden Einsatz der MIPs zur Festphasenextraktion. Bei der chromatographischen Evaluierung der Polymere wurde der Einfluss der molekularen Prägung des zur Polymersynthese verwendeten funktionellen Monomers sowie der mobilen Phase auf die Wechselwirkungen zwischen dem Zielanalyten und dem Polymer ermittelt. Dafür wurden die Retentions-, Prägungs- und Separationsfaktoren berechnet. Der Retentionsfaktor liefert Informationen über das Retentionsvermögen des Polymers gegenüber dem Zielanalyten, wogegen der Prägungsfaktor ein quantitatives Maß zur Beurteilung der selektiven Affinität des MIPs gegenüber dem Zielanalyten darstellt. Mit dem Separationsfaktor soll zusätzlich das Vermögen eines Polymers, den Zielanalyten von strukturähnlichen Molekülen auf Grund der selektiven Wechselwirkungen zu separieren, verdeutlicht werden. Für eine bessere Übersichtlichkeit werden die vorgenannten Parameter zunächst einzeln betrachtet. Danach erfolgt jeweils eine zusammenfassende Diskussion, da insbesondere die Bewertung der Prägungs- und Separationsfaktoren im Zusammenhang mit den erzielten Retentionsfaktoren erfolgen muss.

#### 4.1. Chloramphenicol geprägte Polymere zur Separation von Chloramphenicol

Zur Separation des Antibiotikums Chloramphenicol wurden mehrere Polymere mittels Bulk-Polymerisation synthetisiert, wobei als Templat Chloramphenicol und als funktionelles Monomer 2VPy, DEAEMA oder MAA dienten.

### 4.1.1. Chromatographische Evaluierung

#### 4.1.1.1. Retention des Chloramphenicols

##### 4.1.1.1.1. Einfluss der mobilen Phase

In den Abbildungen 4-1 a – c sind die Retentionsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Chloramphenicols dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den MIPs und NIPs erzielt wurden. Auf allen Polymeren konnte eine zunehmende Retention des Chloramphenicols mit ansteigendem Wasser-Gehalt in den Methanol/Wasser-Mischungen sowie Acetonitril/Wasser-Mischungen ab einem Wasser-Gehalt von 20% festgestellt werden. Bei einer Acetonitril/Wasser-Mischung mit einem Wasser-Anteil größer 90% oder einer Methanol/Wasser-Mischung mit einem Wasser-Anteil größer 80% wurden mehr als 200 min zur Elution des Chloramphenicols benötigt. Dagegen wurde Chloramphenicol kaum oder gar nicht retiniert, wenn weniger als 70% Wasser in den Acetonitril/Wasser-Mischungen bzw. weniger als 30% Wasser in den Methanol/Wasser-Mischungen enthalten waren. Dies wird durch die niedrigen Retentionsfaktoren verdeutlicht, die Werte kleiner 1 zeigten. Mit Acetonitril als mobile Phase konnte insbesondere auf den MIPs eine erhöhte Retention des Chloramphenicols im Vergleich zu den NIPs festgestellt werden. Auf den Polymeren, die mit den funktionellen Monomeren DEAEMA oder 2-VPy synthetisiert wurden, verringerte sich die Retention des Chloramphenicols bei allen getesteten Acetonitril/Wasser- sowie Methanol/Wasser-Mischungen unter Zusatz von 0,1% TFA. Dagegen wirkte sich der Zusatz von 0,1% TFA zur mobilen Phase bei den Polymeren P(CAP\_MAA) und P(MAA) bezüglich der Chloramphenicol-Retention nicht aus.

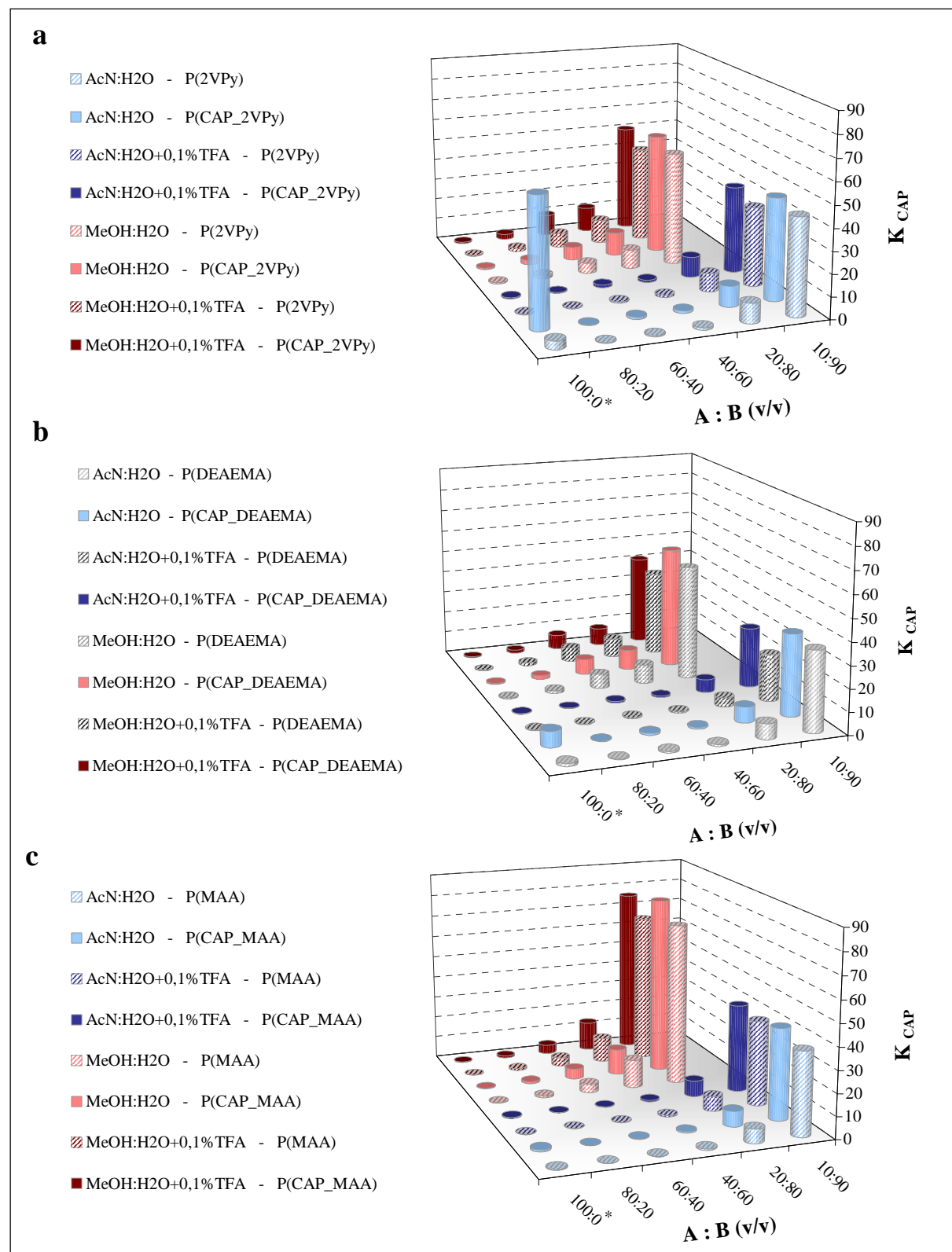


Abb. 4-1: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Chloramphenicols ( $1 \mu\text{mol/ml}$ ; \*  $0,1 \mu\text{mol/ml}$ ) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen ( $A = \text{AcN}$  bzw.  $\text{MeOH}$ ;  $B = \text{H}_2\text{O}$ ) auf den Polymeren, die mit dem funktionellen Monomer 2VPy (a), DEAEMA (b) oder MAA (c) synthetisiert wurden (Zusatz CAP kennzeichnet MIP); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.



In den Tabelle 4-1 und 4-2 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen Wasser, Methanol oder Säure im Acetonitril auf die Chloramphenicol-Retention auswirkten (siehe auch Abb. 4-1 a – c).

Tab. 4-1: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (0,1 µmol/ml) auf den verschiedenen MIPs

Polymer	K <sub>CAP</sub> – P(CAP_2VPy)			K <sub>CAP</sub> – P(CAP_DEAEMA)			K <sub>CAP</sub> – P(CAP_MAA)		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>mobile Phase v/v</b>									
<b>100 : 0</b>	58,65	0,55		7,20	0,30		1,01	0,43	
<b>99 : 1</b>	4,48	0,67	7,01	2,07	0,52	1,06	0,55	0,32	0,46
<b>95 : 5</b>	0,58	0,57	1,35	0,45	0,42	0,62	0,18	0,06	0,17

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-2: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (0,1 µmol/ml) auf den verschiedenen NIPs

Polymer	K <sub>CAP</sub> – P(2VPy)			K <sub>CAP</sub> – P(DEAEMA)			K <sub>CAP</sub> – P(MAA)		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>mobile Phase v/v</b>									
<b>100 : 0</b>	3,84	0,34		1,25	0,29		0,41	0,15	
<b>99 : 1</b>	1,07	0,43	1,66	0,81	0,38	0,80	0,27	0,19	0,21
<b>95 : 5</b>	0,35	0,43	0,56	0,33	0,18	0,61	0,13	0,12	0,13

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Zugabe von 1% Wasser oder Methanol oder 0,1% TFA zum Acetonitril bewirkte eine deutliche Verringerung der Chloramphenicol-Retention auf allen Polymeren. Dies verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen zwischen Chloramphenicol und den Polymeren, unter Verwendung eines apolaren Lösemittels wie Acetonitril, überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen basierten.

### 4.1.1.1.2. Einfluss des funktionellen Monomers

In der Abbildung 4-2 wird die Retention des Chloramphenicols auf den verschiedenen MIPs verglichen.

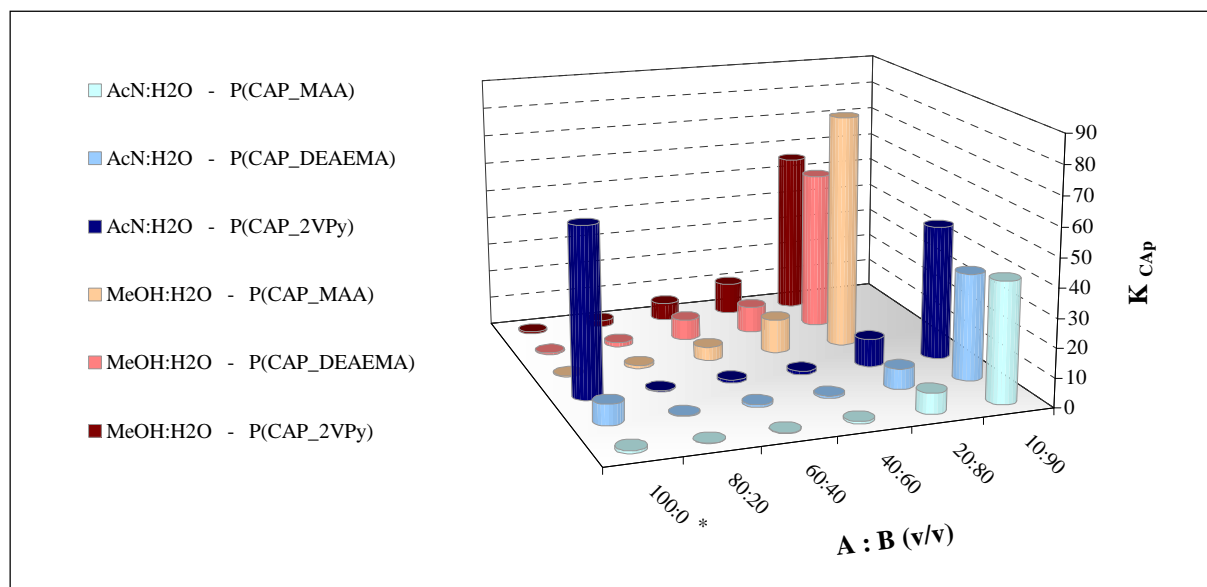


Abb. 4-2: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen MIPs; (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase wurde die größte Chloramphenicol-Retention auf der stationären Phase P(CAP\_2VPy) erreicht, gefolgt von P(CAP\_DEAEMA). Die Polymere, die mit DEAEMA hergestellt wurden, wiesen unter Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen ein geringeres Retentionsvermögen für Chloramphenicol auf, als die mit MAA oder 2VPy synthetisierten Polymere. Das Polymer P(CAP\_2VPy) zeigte im Vergleich zum Polymer P(CAP\_MAA) größere Retentionsfaktoren unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Mischungen. Unter den Methanol/Wasser-Mischungen verhielt es sich umgekehrt, da hier auf dem Polymer P(CAP\_MAA) die größten Retentionsfaktoren erzielt wurden. Dennoch ergab die Retention des Chloramphenicols auf den verschiedenen MIPs und NIPs nur geringfügig unterschiedliche Werte. Nur wenn Acetonitril als mobile Phase diente konnten deutliche Unterschiede bei der Chloramphenicol-Retention auf den verschiedenen Polymeren beobachtet werden.

### 4.1.1.2. Prägungseffekt gegenüber Chloramphenicol

#### 4.1.1.2.1. Einfluss der mobilen Phase

In den Abbildungen 4-3 a – c sind die Prägungsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den verschiedenen MIPs erzielt wurden.

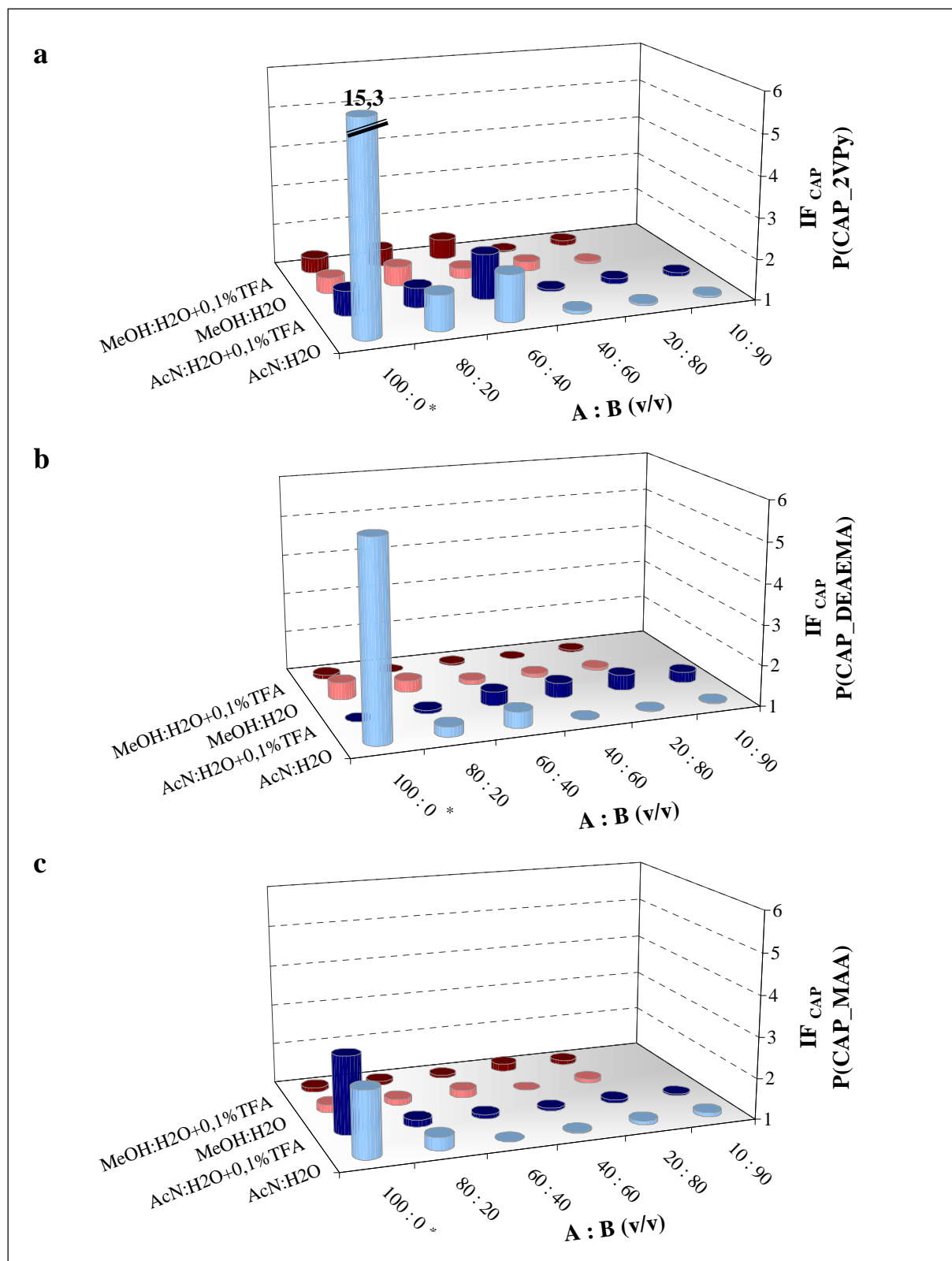


Abb. 4-3: Prägungsfaktoren (IF) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O) auf den MIPs, die mit dem funktionellen Monomer 2VPy (a), DEAEMA (b) oder MAA (c) synthetisiert wurden; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Unter Verwendung von Methanol oder Methanol/Wasser-Mischungen als mobile Phase waren die Prägungsfaktoren kleiner 1,5. Ebenso verhielt es sich bei Acetonitril/Wasser-Mischungen. Nur auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) wurden bei einem Wasser-Anteil kleiner 60% in den Acetonitril/Wasser-Mischungen Prägungsfaktoren um 2 erreicht. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Prägungsfaktoren. Die höchsten Prägungsfaktoren konnten unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase erzielt werden.

In der Tabelle 4-3 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen Wasser, Methanol oder Säure im Acetonitril auf den Prägungseffekt gegenüber dem Zielanalyten Chloramphenicol auswirkten (siehe auch Abb. 4-3 a – c).

Tab. 4-3: Prägungsfaktoren (IF) des Chloramphenicols (0,1 µmol/ml) auf den verschiedenen MIPs

Polymer	IF <sub>CAP</sub> – P(CAP_2VPy)			IF <sub>CAP</sub> – P(CAP_DEAEMA)			IF <sub>CAP</sub> – P(CAP_MAA)		
	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0</b>	15,29	1,60		5,76	1,00		2,61	2,88	
<b>99 : 1</b>	4,18	1,55	3,65	2,54	1,37	1,33	2,08	1,67	2,21
<b>95 : 5</b>	1,66	1,33	1,80	1,38	2,36	1,02	1,38	0,57	1,30

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die in Tabelle 4-3 dargestellten Werte verdeutlichen, dass bereits die Zugabe von 1% Wasser oder Methanol zum Acetonitril eine starke Verringerung des Prägungseffektes bewirkte. Der Zusatz von 0,1% TFA zum Acetonitril verringerte den Prägungseffekt auf den Polymeren P(CAP\_2VPy) und P(CAP\_DEAEMA) noch mehr als es bei der Zugabe von 1% Wasser oder Methanol der Fall war. Dagegen wurde auf dem Polymer P(CAP\_MAA) durch die Zugabe von 0,1% TFA zum Acetonitril der Prägungsfaktor geringfügig erhöht. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass unter diesen Bedingungen nur eine sehr geringe Chloramphenicol-Retention vorlag. Die Verringerung des Prägungseffektes durch Zugabe von Wasser, Methanol oder Säure verdeutlicht, dass die selektiven Wechselwirkungen zwischen Chloramphenicol und den Prägungskavitäten, unter Verwendung eines apolaren Lösemittels wie Acetonitril, überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen basierten.

### 4.1.1.2.2. Einfluss des funktionellen Monomers

In der Abbildung 4-4 wird der Prägungseffekt gegenüber dem Zielanalyten Chloramphenicol auf den verschiedenen MIPs verglichen.

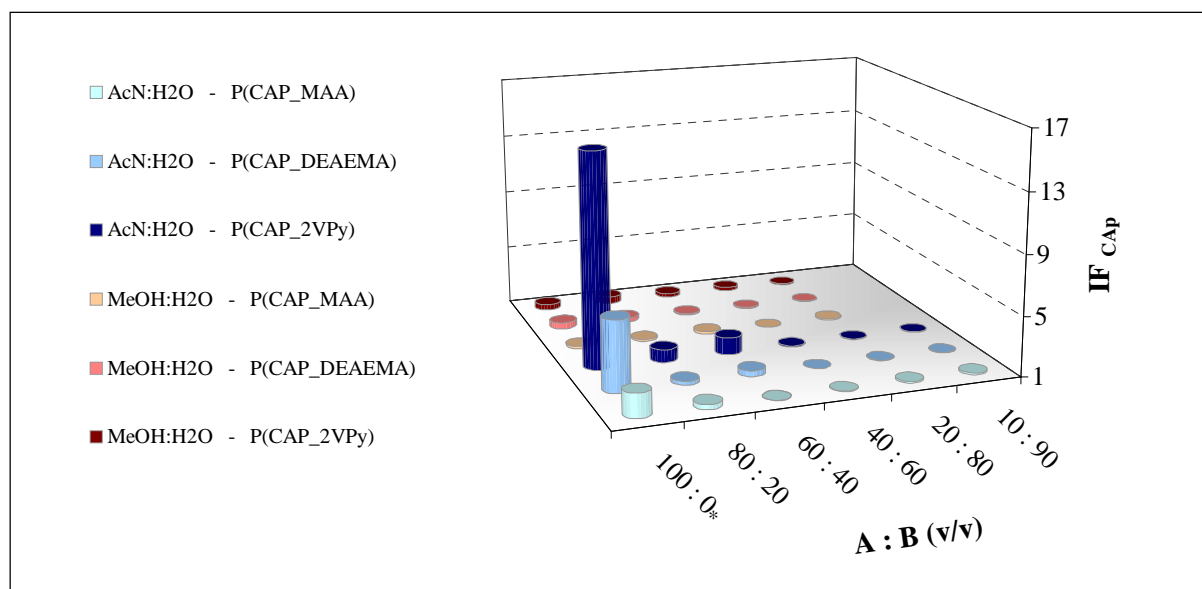


Abb. 4-4: Prägungsfaktoren (IF) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen MIPs; (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die größten Prägungsfaktoren wurden mit den Acetonitril/Wasser- sowie Methanol/Wasser-Mischungen, auch unter Zugabe von TFA, auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) erreicht. Enthielt die mobile Phase mehr als 5% Wasser, betrugen die Prägungsfaktoren nur zwischen 0,8 und 2,1. Die mobile Phase Acetonitril ergab auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) den höchsten Prägungsfaktor (IF = 15,29). Dies verdeutlicht, dass der Prägungseffekt insbesondere in Acetonitril stark vom verwendeten funktionellen Monomer abhängig war.

### 4.1.1.3. Separation des Chloramphenicols

#### 4.1.1.3.1. Retention des Florfenicols und Thiamphenicols

In den Abbildungen 4-5 a – b sind die Retentionsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Florfenicols und Thiamphenicols dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den MIPs erzielt wurden.

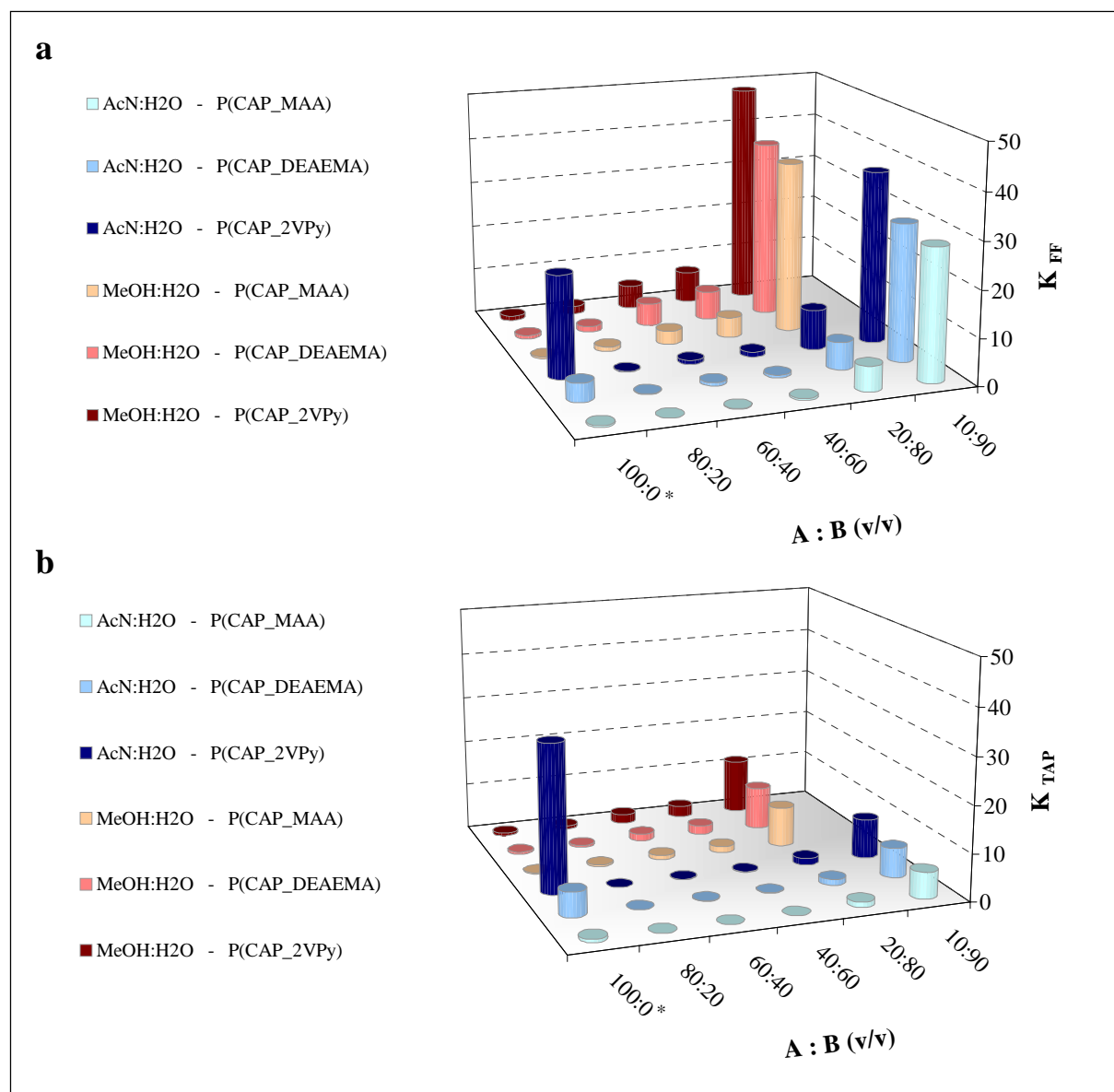


Abb. 4-5: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Florfenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Thiamphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b); (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die zum Chloramphenicol strukturähnlichen Moleküle Florfenicol und Thiamphenicol (siehe Abschnitt 2.2.1.) wurden ebenfalls von den getesteten MIPs und NIPs retiniert. Allerdings war deren Retention geringer als die des Chloramphenicols. Auf allen Polymeren konnte eine zunehmende Retention des Florfenicols und Thiamphenicols mit ansteigendem Wassergehalt in den Acetonitril/Wasser- sowie Methanol/Wasser-Mischungen ab einem Wassergehalt von 20% festgestellt werden. Florfenicol wurde im wässrigen Milieu stärker retiniert als Thiamphenicol. Beinhaltete die mobile Phase weniger als 70% Wasser in den

Acetonitril/Wasser-Mischungen bzw. weniger als 30% Wasser in den Methanol/Wasser-Mischungen, wurden Florfenicol und Thiamphenicol kaum oder gar nicht retiniert, so dass Retentionsfaktoren kleiner 1 resultierten. Mit Acetonitril als mobile Phase konnte auf den MIPs, ebenso wie bei Chloramphenicol, eine erhöhte Retention des Florfenicols und Thiamphenicols festgestellt werden. Dabei wurde Thiamphenicol stärker als Florfenicol retiniert. Der Zusatz von 0,1% TFA zur mobilen Phase bewirkte insbesondere unter Verwendung von Acetonitril sowie Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen, die Wasser-Anteile größer 50% hatten, eine Verringerung der Retention des Florfenicols und Thiamphenicols (siehe Anhang A1).

In den Tabelle 4-4 und 4-5 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen an Wasser, Methanol oder Säure im Acetonitril auf die Retention des Florfenicols und Thiamphenicols auswirkten.

Tab. 4-4: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (0,1 µmol/ml) auf den verschiedenen MIPs

Polymer	K <sub>FF</sub> – P(CAP_2VPy)			K <sub>FF</sub> – P(CAP_DEAEMA)			K <sub>FF</sub> – P(CAP_MAA)		
mobile Phase v/v	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
100 : 0	21,98	0,21		4,03	0,10		0,38	0,06	
99 : 1	1,89	0,29	3,25	1,06	0,22	0,46	0,25	0,43	0,29
95 : 5	0,23	0,24	0,58	0,15	0,16	0,27	0,07	-0,02	0,06

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-5: Retentionsfaktoren (K) des Thiamphenicols (0,1 µmol/ml) auf den verschiedenen MIPs

Polymer	K <sub>TAP</sub> – P(CAP_2VPy)			K <sub>TAP</sub> – P(CAP_DEAEMA)			K <sub>TAP</sub> – P(CAP_MAA)		
mobile Phase v/v	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
100 : 0	31,76	0,38		5,32	0,21		0,69	0,24	
99 : 1	3,18	0,47	4,85	1,53	0,38	0,75	0,37	0,18	0,30
95 : 5	0,34	0,35	0,90	0,24	0,29	0,41	0,10	0,00	0,09

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Zugabe von nur 1% Wasser oder Methanol oder 0,1% TFA zum Acetonitril bewirkte eine deutliche Verringerung der Florfenicol- und Thiamphenicol-Retention auf allen Polymeren. Dies verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen zwischen Florfenicol bzw. Thiamphenicol und dem MIP, unter Verwendung eines apolaren Lösemittels, wie beim Chloramphenicol, ebenfalls überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen basierten.

#### 4.1.1.3.2. Einfluss der mobilen Phase

Die Tabellen 4-6 und 4-7 zeigen die Separation (Abschnitt 3.2.4.1.) des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol auf den verschiedenen Polymeren unter Verwendung von Acetonitril/Wasser- und Acetonitril/Methanol-Mischungen.

Tab. 4-6: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Florfenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen MIPs

Polymer	$\alpha_{\text{FF}} - \text{P(CAP\_2VPy)}$			$\alpha_{\text{FF}} - \text{P(CAP\_DEAEMA)}$			$\alpha_{\text{FF}} - \text{P(CAP\_MAA)}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>mobile Phase</b> <b>v/v</b>									
<b>100 : 0*</b>	2,67	2,64		1,79	2,87		2,61	7,68	
<b>99 : 1*</b>	2,36	2,34	2,16	1,95	2,42	2,31	2,18	0,75	1,58
<b>95 : 5*</b>	2,51	2,38	2,33	2,94	2,71	2,32	2,47	2,57	2,74
<b>80 : 20</b>	1,84	1,82	2,54	2,20	3,90	2,39	1,76	4,73	2,19
<b>60 : 40</b>	1,18	1,31	1,54	1,28	1,48	1,78	1,28	0,93	2,27
<b>40 : 60</b>	1,14	1,26	2,17	1,26	1,50	1,44	1,56	1,82	1,40
<b>20 : 80</b>	1,12	1,24	1,25	1,19	1,32	1,20	1,32	1,77	1,06
<b>10 : 90</b>	1,26	1,29	0,88	1,25	1,30	0,79	1,46	1,58	0,89

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.



Tab. 4-7: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Thiamphenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen MIPs

Polymer	$\alpha_{\text{TAP}} - \text{P(CAP\_2VPy)}$			$\alpha_{\text{TAP}} - \text{P(CAP\_DEAEMA)}$			$\alpha_{\text{TAP}} - \text{P(CAP\_MAA)}$		
mobile Phase v/v	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	1,85	1,43		1,35	1,42		1,45	1,79	
<b>99 : 1*</b>	1,41	1,43	1,45	1,35	1,37	1,42	1,50	1,76	1,54
<b>95 : 5*</b>	1,72	1,64	1,50	1,89	1,46	1,51	1,76	15,00	1,95
<b>80 : 20</b>	21,86	5,73	1,78	50,20	6,00	1,78	1,55	0,82	1,64
<b>60 : 40</b>	8,73	6,08	2,18	7,62	26,14	2,01	19,47	6,52	1,56
<b>40 : 60</b>	7,79	6,94	2,40	7,22	9,04	2,33	20,85	25,36	1,40
<b>20 : 80</b>	6,77	5,18	2,48	5,52	6,35	1,61	6,08	9,72	1,96
<b>10 : 90</b>	5,55	5,31	1,76	5,77	5,85	1,41	7,31	8,01	1,45

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Separationsfaktoren mit Werten größer 1 zeigen, dass Chloramphenicol in Acetonitril/Wasser-Mischungen von den Polymeren stärker retiniert wurde als Florfenicol und Thiamphenicol. Die NIPs wiesen geringere Separationsfaktoren für Chloramphenicol bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol als die entsprechenden MIPs auf. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass mit höherem Wasser-Anteil in den Acetonitril/Wasser-Mischungen die Separation zunahm. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Acetonitril/Wasser-Mischungen hatte keinen Einfluss auf die Separation. Abgesehen vom Polymer P(CAP\_2VPy) nahmen die Separationsfaktoren durch Zugabe von 1% Wasser oder Methanol oder 0,1% TFA zum Acetonitril zu. Dies deutet darauf hin, dass Florfenicol und Thiamphenicol weniger dazu in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden als Chloramphenicol. Da aber Wasserstoffbrückenbindungen insbesondere bei dem Polymer P(CAP\_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase für die selektiven Wechselwirkungen von Bedeutung waren, verringerte sich die Separation, wenn die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Wasser, Methanol oder TFA gestört wurden. Im Gegensatz zum wässrigen Milieu wurde unter Verwendung von Acetonitril Florfenicol stärker vom Chloramphenicol separiert als Thiamphenicol. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass beim Florfenicol eine Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom ersetzt ist. Da die Wasserstoffbrückenbindungen als Wechselwirkungen im Acetonitril

zwischen dem Molekül und der molekularen Prägungsstelle überwogen, wurde Florfenicol folglich weniger vom Polymer zurückgehalten, so dass es stärker vom Chloramphenicol separierte.

In der Abbildung 4-6 sind die Separationsfaktoren des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol auf den verschiedenen Polymeren unter Verwendung von Methanol/Wasser-Mischungen als mobile Phase dargestellt.

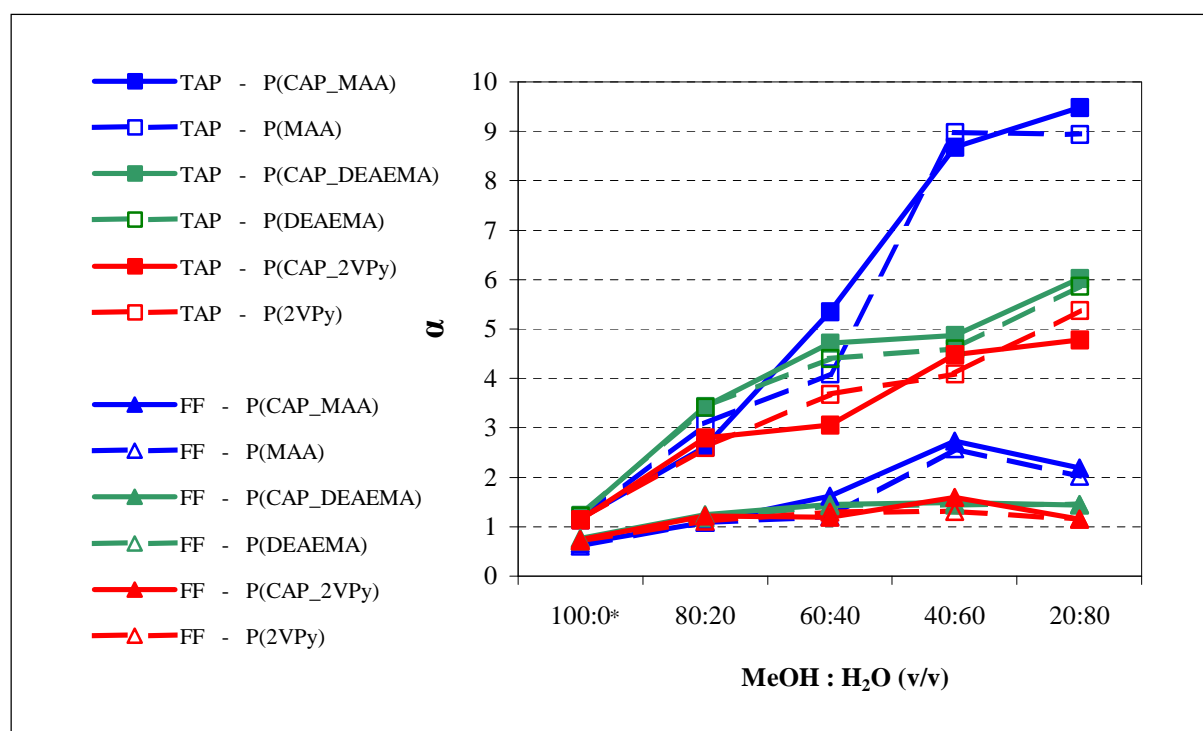


Abb. 4-6: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Florfenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Thiamphenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (Zusatz CAP kennzeichnet MIP); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Separationsfaktoren mit Werten größer 1 zeigen, dass Chloramphenicol von den Polymeren stärker retiniert wurde als Florfenicol und Thiamphenicol. Die NIPs wiesen geringere Separationsfaktoren für Chloramphenicol bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol als die entsprechenden MIPs auf. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass mit höherem Wasser-Anteil in den Methanol/Wasser-Mischungen die Separation zunahm. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Methanol/Wasser-Mischungen hatte keinen Einfluss auf die Separation. Thiamphenicol wurde im wässrigen Milieu deutlich stärker separiert als

Florfenicol, da offensichtlich Thiamphenicol weniger in der Lage ist, hydrophobe Wechselwirkungen mit den Polymeren einzugehen.

In den Abbildungen 4-7 a – b ist die Separation des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol an ausgewählten Beispielen dargestellt.

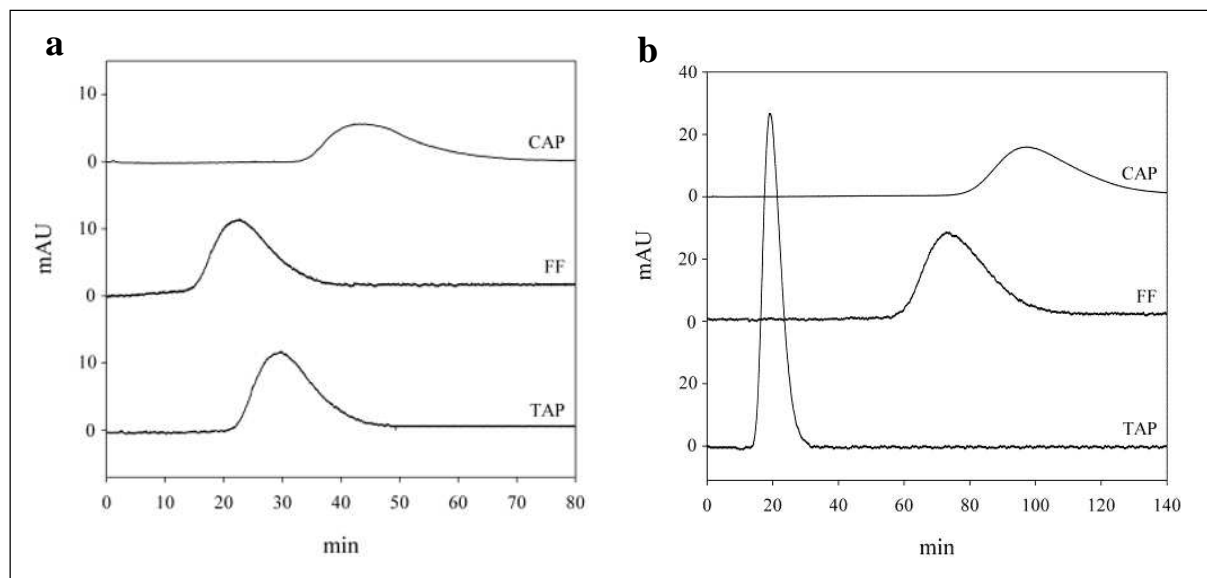


Abb. 4-7: Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(CAP\_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril (a) oder Methanol/Wasser (15:85; v/v) (b) als mobile Phase; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Für Florfenicol wurden Separationsfaktor zwischen 1 und 4 erreicht. Da aber bei der chromatographischen Trennung auf MIPs die Problematik bestand, dass retenierte Verbindungen in einem breiten Peak eluierten, konnte auf keinem Polymer eine Basislinientrennung zwischen Chloramphenicol und Florfenicol erreicht werden. Für Thiamphenicol wurden mit einigen mobilen Phasen Separationsfaktoren bis 50 erzielt. Diese sind aber von geringer Relevanz, da sie sich nur rechnerisch auf Grund der sehr geringen Retention der Testverbindungen, mit Retentionsfaktoren von annähernd Null, ergaben. Dies wird mit der nachstehenden Berechnung verdeutlicht, wobei als stationäre Phase das Polymer P(CAP\_DEAEMA) und als mobile Phase Acetonitril/Wasser (80:20; v/v) diente:

$$\alpha = K_{\text{CAP}} / K_{\text{TAP}} \rightarrow 0,251 / 0,005 = 50,2$$

Eine Basislinientrennung zwischen Chloramphenicol und Thiamphenicol wurde mit den Acetonitril/Wasser-Mischungen ab einem Wasser-Gehalt von 70% sowie mit den

Methanol/Wasser-Mischungen ab einem Wasser-Gehalt von 40% erreicht. Dies verdeutlicht zusätzlich, dass hohe Separationsfaktoren nur von Bedeutung sind, wenn gleichzeitig auch eine deutliche Retention des Zielanalytens am Polymer vorlag. Unter Verwendung von Acetonitril, wobei in dieser mobilen Phase die Chloramphenicol-Retention auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen basierte, konnte keine Basislinientrennung zwischen Chloramphenicol und Florfenicol sowie Thiamphenicol erzielt werden, da die retenierten Analyten in breiten Peaks eluierten.

### 4.1.1.3.3. Einfluss des funktionellen Monomers

Im wässrigen Milieu zeigten die mit MAA synthetisierten Polymere ein geringfügig größeres Separationsvermögen als die mit DEAEMA oder 2VPy synthetisierten Polymere. Mit Acetonitril als mobile Phase konnte abgesehen vom Polymer P(CAP\_2VPy), das eine etwas höhere Separation zeigte, kein Unterschied zwischen den verschiedenen Polymeren festgestellt werden. Das höhere Separationsvermögen des Polymers P(CAP\_2VPy) in Acetonitril bestätigt den hohen Prägungsfaktor (Tab. 4-6; 4-7; Abb. 4-6).

### 4.1.1.4. Zusammenfassende Betrachtung

Die vorliegenden Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Retention des Chloramphenicols auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen beruhte, wenn Acetonitril als mobile Phase verwendet wurde. Dies stimmt mit den Erkenntnissen von Levi et al. (1997) und Suárez-Rodríguez und Díaz-García (2001) überein (siehe Abschnitt 2.2.5.). Deshalb führte die Zugabe von nur 1% Wasser oder Methanol oder von 0,1% TFA zu einer deutlichen Abnahme der Chloramphenicol-Retention (Tab. 4-8). Florfenicol und Thiamphenicol wurden in Acetonitril geringer reteniert als Chloramphenicol, wobei Florfenicol die geringsten Retentionsfaktoren aufwies. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Florfenicol und Thiamphenicol anstelle der Nitrogruppe eine Methylsulfonylgruppe besitzen und des Weiteren Florfenicol anstelle einer Hydroxylgruppe ein Fluoratom beinhaltet.

Die starke Retention des Chloramphenicols im wässrigen Milieu ist auf zusätzliche nicht selektive hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen, da die Prägungsfaktoren nur Werte

kleiner 1,5 aufwiesen. Die geringen Prägungseffekte trotz starker Retention resultierten daraus, dass auch die NIPs Chloramphenicol im wässrigen Milieu retenierten (siehe auch Schirmer & Meisel, 2006). Dennoch war die molekulare Prägung auch im wässrigen Milieu von Bedeutung, da die MIPs eine größere Separation des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol aufwiesen als die entsprechenden NIPs. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine sorgfältige Wahl des funktionellen Monomers zur Polymersynthese für eine erfolgreiche Wiedererkennung des Zielmoleküls von den molekular geprägten Bindungsstellen in der Polymermatrix von großen Einfluss war (Tab 4-9).

In den Tabellen 4-8 und 4-9 werden die Ergebnisse dieser Arbeit denen aus der Literatur gegenübergestellt.

Tab. 4-8: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur: chromatographische Evaluierung zum Einfluss eines protischen Lösemittels im Acetonitril

Quelle	Verhältnis AcN:MeOH (v/v)	MIP			NIP			IF <sub>CAP</sub>
		K <sub>CAP</sub>	K <sub>TAP</sub>	α <sub>TAP</sub>	K <sub>CAP</sub>	K <sub>TAP</sub>	α <sub>TAP</sub>	
Ergebnisse dieser Arbeit *	100 : 0	58,65	31,76	1,85	3,84	2,58	1,49	15,29
	99 : 1	7,01	4,85	1,45	1,66	1,12	1,48	4,22
	95 : 5	1,35	0,90	1,50	0,56	0,35	1,60	2,42
	0 : 100	0,72	0,63	1,15	0,52	0,46	1,14	1,39
Suárez- Rodríguez, Díaz-García (2001) <sup>‡</sup>	100 : 0	21,43	13,63	1,57	4,84	3,05	1,59	4,43
	99 : 1	4,42	3,18	1,39	1,87	1,20	1,56	2,37
	95 : 5	0,88	0,60	1,47	0,79	0,46	1,72	1,11
	0 : 100	-0,43	-0,48	0,90	-0,44	-0,45	0,98	0,99

\* eigene Ergebnisse – Polymer: Templat Chloramphenicol, fkt. Monomer 2VPy, molares Verhältnis fkt. Monomer:Templat von 12:1, Quervernetzer EDMA, Initiator AIBN, Porogen Chloroform, Bulk-Polymerisation; HPLC-Bedingungen: Flussrate 1 ml/min, Injektionsvolumen 10 µl, Analytenkonzentration 0,03 µg/ml; (siehe auch Abschnitt 3.2.2. und 3.2.4.1.)

<sup>‡</sup> Suárez-Rodríguez & Díaz-García (2001) – Polymer: Templat Chloramphenicol, fkt. Monomere DEAEMA:2VPy im molaren Verhältnis 1:3, molares Verhältnis fkt. Monomer:Templat von 2:1, Quervernetzer EDMA, Initiator AIBN, Porogen Tetrahydrofuran, Bulk-Polymerisation; HPLC-Bedingungen: Flussrate 1 ml/min, Injektionsvolumen 10 µl, Analytenkonzentration 2 mg/ml; (siehe auch Abschnitt 2.2.5.)

Suárez-Rodríguez und Díaz-García (2001) zeigten mit ihren Untersuchungen ebenfalls, dass die Zugabe eines protischen Lösemittels zum Acetonitril eine Verminderung der Retention

vom Chloramphenicol, aber auch Thiamphenicol, bewirkte, da die Wechselwirkungen auf Wasserstoffbrückenbindungen beruhten (Abschnitt 2.2.5.). Daher wurden bei den Untersuchungen der vorgenannten Autoren die Analyten Chloramphenicol und Thiamphenicol in Methanol nicht reteniert.

Tab. 4-9: Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur: chromatographische Evaluierung mit Acetonitril als mobile Phase zum Einfluss des funktionellen Monomers

fkt. Monomer	Quelle	MIP			NIP			IF <sub>CAP</sub>
		K <sub>CAP</sub>	K <sub>TAP</sub>	$\alpha$ <sub>TAP</sub>	K <sub>CAP</sub>	K <sub>TAP</sub>	$\alpha$ <sub>TAP</sub>	
<b>2VPy</b>	Ergebnisse dieser Arbeit *	58,65	31,76	1,85	3,84	2,58	1,49	15,29
	Suárez-Rodríguez, Díaz-García (2001) ‡	13,21	9,13	1,45	0,60	0,51	1,18	22,02
<b>DEAEMA</b>	Ergebnisse dieser Arbeit *	7,20	5,32	1,35	1,25	0,85	1,47	5,76
	Suárez-Rodríguez, Díaz-García (2001) ‡	12,83	8,88	1,44	2,59	1,70	1,52	4,95
	Levi et al. (1997) †	17,36	9,09	1,91	1,75	1,14	1,54	9,92
<b>MAA</b>	Ergebnisse dieser Arbeit *	1,01	0,69	1,45	0,41	0,29	1,41	2,61
	Suárez-Rodríguez, Díaz-García (2001) ‡	0,33	0,26	1,27	0,29	0,23	1,26	1,14

\* eigene Ergebnisse – Polymere: Templat Chloramphenicol, molares Verhältnis fkt. Monomer:Templat von 12:1, Quervernetzer EDMA, Initiator AIBN, Porogen Chloroform, Bulk-Polymerisation; HPLC-Bedingungen: mobile Phase Acetonitril, Flussrate 1 ml/min, Injektionsvolumen 10 µl, Analytenkonzentration 0,03 µg/ml; (siehe auch Abschnitt 3.2.2. und 3.2.4.1.)

‡ Suárez-Rodríguez & Díaz-García (2001) – Polymere: Templat Chloramphenicol, Quervernetzer EDMA, Initiator AIBN, Porogen Tetrahydrofuran, Bulk-Polymerisation; HPLC-Bedingungen: mobile Phase Acetonitril, Flussrate 1 ml/min, Injektionsvolumen 10 µl, Analytenkonzentration 2 mg/ml; (siehe auch Abschnitt 2.2.5.)

† Levi et al. (1997) – Polymer: Templat Chloramphenicol, molares Verhältnis fkt. Monomer:Templat von 2:1, Quervernetzer EDMA, Initiator AIBN, Porogen Tetrahydrofuran, Bulk-Polymerisation; HPLC-Bedingungen: mobile Phase Acetonitril, Flussrate 2 ml/min, Injektionsvolumen 10 µl, Analytenkonzentration 0,1 mg/ml; (siehe auch Abschnitt 2.2.5.)

Die Feststellung, dass die größten Retentionsfaktoren und Prägungsfaktoren erzielt wurden, wenn als funktionelles Monomer 2VPy oder DEAEMA bei der Polymersynthese dienten, stimmt mit den Erkenntnissen aus der Literatur überein. Allerdings erzielte das Polymer

P(CAP\_2VPy) eine 4,4fach höhere Retention des Chloramphenicols als das mit 2VPy synthetisierte Polymer in der Arbeit von Suárez-Rodríguez und Díaz-García (2001). Das Retentionsvermögen des Polymers P(CAP\_DEAEMA) war niedriger als die in der Literatur getesteten DEAEMA-Polymere. Die mit MAA synthetisierten Polymere retenierten Chloramphenicol in dieser Arbeit wie auch in der Literatur nur gering, wenn Acetonitril als mobile Phase verwendet wurde. Thiamphenicol wurde in Übereinstimmung mit den Literaturergebnissen auf allen Polymeren geringer reteniert als Chloramphenicol. Somit wiesen die Separationsfaktoren Werte von größer 1 auf, wobei die Separationsfaktoren für Thiamphenicol aus der Literatur mit denen dieser Arbeit vergleichbar waren.

MIPs zeigen in der HPLC eine geringe chromatographische Effizienz, auf Grund breiter Peaks sowie Peakasymmetrien (Kempe & Mosbach, 1995; Sellergren & Shea, 1995). Dies konnte auch bei den vorher dargestellten Untersuchungen beobachtet werden. Diese Problematik ist jedoch für den Einsatz der Chloramphenicol geprägten Bulk-Polymere als Sorbentien in der Festphasenextraktion mit dem Ziel der Abtrennung von Matrix sowie Aufkonzentrierung des Zielanalyten nicht von Bedeutung (Abschnitt 4.1.2.).

#### **4.1.2. Manuelle Festphasenextraktion des Chloramphenicols**

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen HPLC-Untersuchungen wurden verschiedene Waschlösungen bei der Festphasenextraktion von Chloramphenicol getestet. Um die hydrophoben Wechselwirkungen nutzen zu können, wurden Methanol/Wasser-, Acetonitril/Wasser- und Ethylacetat/Wasser-Mischungen verwendet. Acetonitril und Ethylacetat dienten als Waschlösung, um die selektiven Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Zielmolekül und der molekularen Prägung zur Extraktion des Chloramphenicols zu nutzen. Als SPE-Sorbentien wurden die mit den funktionellen Monomeren 2VPy oder MAA synthetisierten Polymere verwendet. Das Polymer P(CAP\_2VPy) ermöglichte die selektive Retention auf Grund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Chloramphenicol und den Prägungskavitäten in apolaren Lösemitteln. In wässrigen Lösemitteln zeigte dagegen das Polymer P(CAP\_MAA)

das größte Retentionsvermögen gegenüber Chloramphenicol, wobei diese auf nicht selektiven hydrophoben Wechselwirkungen basierten.

### 4.1.2.1. Standardverdünnungsreihe vom Chloramphenicol

Die Standardverdünnungsreihe vom Chloramphenicol diente der Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie in welchem Messbereich bei der RP18-HPLC Chloramphenicol, das über Festphasenextraktion eluierte, mit höchst möglicher Genauigkeit quantitativ bestimmt werden konnte. Die ermittelte lineare Kalibrierung sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind in der Tabelle 4-10 und der Abbildung 4-8 dargestellt.

Tab. 4-10: Lineare Kalibrierung sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze vom Chloramphenicol

<b>Kalibrationsbereich</b>	1 – 500 nmol/ml (0,32 – 161,57 µg/ml)
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µl
<b>Anzahl der Werte</b>	15
<b>Lineare Kalibrierung</b>	
Geradengleichung $y = a + bx$	$y = -1054,57 + 30723,50x$
Korrelationskoeffizient (r)	0,9999
<b>Nachweisgrenze</b>	
Nachweisgrenze *	0,32 nmol/ml (0,10 µg/ml)
Nachweisgrenze ‡	0,29 nmol/ml (0,10 µg/ml)
<b>Bestimmungsgrenze</b>	
Bestimmungsgrenze *	1,10 nmol/ml (0,35 µg/ml)
Bestimmungsgrenze ‡	0,97 nmol/ml (0,31 µg/ml)

\* berechnet nach DIN 32645; ‡ berechnet nach Kromidas, 1999, S. 179

HPLC-Bedingungen zur Erstellung der Standardverdünnungsreihe siehe Abschnitt 3.2.4.2.



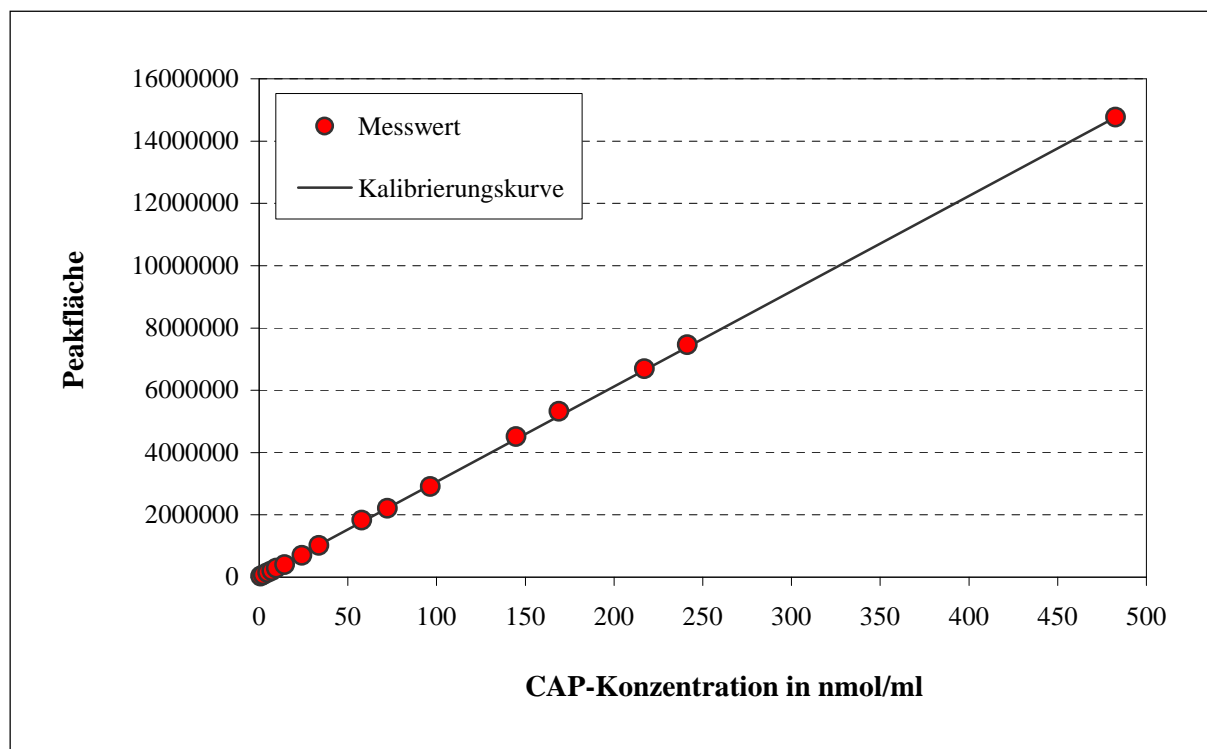


Abb. 4-8: Kalibrierungskurve vom Chloramphenicol; HPLC-Bedingungen zur Erstellung der Standardverdünnungsreihe siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Eine lineare Korrelation ( $r = 0,9999$ ) der Peakfläche mit der aufgespritzten Konzentration, wobei das Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$  umfasste, bestand bei Konzentrationen zwischen 1 nmol/ml (0,31  $\mu\text{g/ml}$ ) und 500 nmol/ml (161,57  $\mu\text{g/ml}$ ). Bei Konzentrationen größer 500 nmol/ml bestand keine lineare Übereinstimmung der Peakfläche mit der aufgespritzten Konzentration, so dass die ermittelten Chloramphenicol-Wiederfindungen zu niedrig wären. Folglich müssen die Proben, die mit RP18-HPLC analysiert werden, eine Chloramphenicol-Konzentration zwischen 1 nmol/ml (0,31  $\mu\text{g/ml}$ ) und 500 nmol/ml (161,57  $\mu\text{g/ml}$ ) aufweisen.

### 4.1.2.2. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen

In den Tabellen 4-11 bis 4-13 sind die Wiederfindungen des Chloramphenicols nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung dargestellt, wobei als Waschlösungen Methanol/Wasser-, Acetonitril/Wasser- oder Ethylacetat/Wasser-Mischungen dienten.

Tab. 4-11: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (100 nmol/100 µl) unter Verwendung verschiedener Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösung

	CAP-Wiederfindung (%)							
Polymer	P(CAP_2VPy)		P(2VPy)		P(CAP_MAA)		P(MAA)	
MeOH:H <sub>2</sub> O (v/v)	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution
<b>40 : 60</b>	95,5	<b>3,3</b>	95,9	<b>3,0</b>	99,2	<b>0,8</b>	95,8	<b>3,1</b>
<b>35 : 65</b>	84,5	<b>15,3</b>	80,0	<b>20,8</b>	93,1	<b>5,2</b>	91,3	<b>7,1</b>
<b>30 : 70</b>	29,6	<b>68,5</b>	11,0	<b>88,5</b>	19,1	<b>81,1</b>	27,9	<b>70,9</b>
<b>25 : 85</b>	9,8	<b>92,8</b>	2,9	<b>95,5</b>	1,9	<b>99,8</b>	1,3	<b>98,4</b>
<b>20 : 80</b>	0,1	<b>99,1</b>	0,2	<b>100,6</b>	0,0	<b>100,4</b>	0,3	<b>99,1</b>
<b>15 : 85</b>	0,0	<b>97,5</b>	0,0	<b>101,2</b>	0,0	<b>98,4</b>	0,0	<b>99,3</b>
<b>10 : 90</b>	0,0	<b>101,2</b>	0,0	<b>100,1</b>	0,0	<b>101,9</b>	0,0	<b>99,8</b>
<b>5 : 95</b>	0,0	<b>98,5</b>	0,0	<b>99,9</b>	0,0	<b>100,8</b>	0,0	<b>101,5</b>
<b>0 : 100</b>	0,0	<b>102,0</b>	0,0	<b>100,3</b>	0,0	<b>99,3</b>	0,0	<b>100,5</b>

SPE-Bedingungen: 100 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl MeOH:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser; Waschen mit 10 ml Waschlösung; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Tab. 4-12: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (100 nmol/100 µl) unter Verwendung verschiedener Acetonitril/Wasser-Mischungen als Waschlösung

	CAP-Wiederfindung (%)							
Polymer	P(CAP_2VPy)		P(2VPy)		P(CAP_MAA)		P(MAA)	
AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution
<b>30 : 70</b>	100,1	<b>0,5</b>	101,5	<b>0,2</b>	101,3	<b>0,4</b>	98,1	<b>0,4</b>
<b>25 : 85</b>	100,3	<b>0,4</b>	101,5	<b>0,3</b>	98,5	<b>0,3</b>	100,7	<b>0,2</b>
<b>20 : 80</b>	101,3	<b>0,2</b>	101,2	<b>0,2</b>	99,2	<b>0,3</b>	99,9	<b>0,3</b>
<b>15 : 85</b>	97,3	<b>2,2</b>	97,6	<b>3,2</b>	101,4	<b>0,6</b>	95,7	<b>3,4</b>
<b>10 : 90</b>	12,9	<b>85,4</b>	0,2	<b>100,7</b>	3,1	<b>98,0</b>	1,4	<b>98,3</b>
<b>5 : 95</b>	0,0	<b>98,9</b>	0,0	<b>99,1</b>	0,0	<b>100,7</b>	0,0	<b>98,0</b>
<b>0 : 100</b>	0,0	<b>102,0</b>	0,0	<b>100,3</b>	0,0	<b>99,3</b>	0,0	<b>100,5</b>

SPE-Bedingungen: 100 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl AcN:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser; Waschen mit 10 ml Waschlösung; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Tab. 4-13: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (100 nmol/100 µl) unter Verwendung verschiedener Ethylacetat/Wasser-Mischungen als Waschlösung

Polymer	CAP-Wiederfindung (%)							
	P(CAP_2VPy)		P(2VPy)		P(CAP_MAA)		P(MAA)	
EtAc : H <sub>2</sub> O (v/v)	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution
<b>10 : 90</b>	98,9	<b>0,4</b>	98,3	<b>0,3</b>	98,8	<b>0,3</b>	98,5	<b>1,6</b>
<b>5 : 95</b>	22,2	<b>76,4</b>	4,5	<b>94,8</b>	88,1	<b>11,0</b>	68,8	<b>30,1</b>
<b>0 : 100</b>	0,0	<b>102,0</b>	0,0	<b>100,3</b>	0,0	<b>99,3</b>	0,0	<b>100,5</b>

SPE-Bedingungen: 100 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl EtAc:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser; Waschen mit 10 ml Waschlösung; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Betrag der Methanol-Gehalt weniger als 25% bzw. der Acetonitril-Gehalt weniger als 10% in der Waschlösung, wurde eine Chloramphenicol-Wiederfindung von annähernd 100% im Eluat erreicht. Bei einem Methanol-Anteil von mehr als 20% bzw. einem Acetonitril-Anteil von mehr als 5% eluierte Chloramphenicol schon während des Waschens von der SPE-Kartusche, was zu verminderten Wiederfindungen führte. Beinhaltete die wässrige Waschlösung Ethylacetat, eluierte Chloramphenicol schon während des Waschens von der SPE-Kartusche, was zu verminderten Wiederfindungen führte.

Der Vergleich der verschiedenen wässrigen Waschlösungen zeigte, dass Chloramphenicol bei einem Methanol-Gehalt größer 20%, einem Acetonitril-Anteil größer 5% oder einem Ethylacetat-Gehalt von 5% schon während des Waschschrtes von der Kartusche eluierte. Die Elutionskraft der Waschlösung wurde mit zunehmenden Methanol-, Acetonitril- oder Ethylacetat-Gehalt größer. Dies verdeutlicht, dass apolarere Lösemittel in Wasser die hydrophoben Wechselwirkungen des Chloramphenicols mit der Polymermatrix verringerten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass je apolarer das zum Wasser zugemischte Lösemittel ist, desto stärker wurden die hydrophoben Wechselwirkungen gestört. Dies entspricht den Ergebnissen der chromatischen Evaluierung, wobei Acetonitril ebenfalls eine stärkere Verringerung der hydrophoben Wechselwirkungen in wässrigen Lösemittelmischungen aufwies als Methanol (Abschnitt 4.1.1.1.). Die als Sorbent eingesetzten Polymere P(CAP\_MAA) und P(MAA) ergaben geringfügig höhere Wiederfindungen als die Polymere P(CAP\_2VPy) und P(2VPy) bei der Festphasenextraktion vom Chloramphenicol unter

Verwendung wässriger Lösemittelmischungen als Waschlösung. Bei der chromatographischen Evaluierung wurden ebenfalls diese Unterschiede zwischen den Polymeren beobachtet, wenn als mobile Phase eine wässrige Lösemittelmischung diente (Abschnitt 4.1.1.1.2.).

#### 4.1.2.3. Waschen mit Acetonitril

Die Tabelle 4-14 zeigt die Chloramphenicol-Wiederfindung, die nach Festphasenextraktion mit Acetonitril als Waschlösung erhalten wurden.

Tab. 4-14: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (2,5 nmol/100 µl) unter Verwendung von Acetonitril als Waschlösung

Kartuschen-Füllung	Polymer	CAP-Wiederfindung (%)				Summe
		1. Waschen 1 ml AcN	2. Waschen 1 ml AcN	3. Waschen 3 ml AcN	Elution	
50 mg	P(CAP_2Vpy)	4,0	54,2	35,6	5,5	99,2
100 mg	P(CAP_2Vpy)	1,6	3,6	65,8	29,3	100,3
	P(2Vpy)	87,0	8,8	2,5	3,2	101,5
	P(CAP_MAA)	88,3	5,4	1,6	3,8	99,1
	P(MAA)	84,7	4,3	1,6	8,2	98,7

SPE-Bedingungen: 2,5 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl Acetonitril; Kartuschen mit 50 mg oder 100 mg Polymer gepackt; Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Wurde Acetonitril als Waschlösung verwendet, eluierte ein geringer Anteil des aufgetragenen Chloramphenicols während des Waschens von der Kartusche. Allerdings umfasste der Chloramphenicol-Verlust während der ersten zwei Milliliter des Waschens ungefähr 5%, wenn als Sorbent 100 mg P(CAP\_2Vpy) eingesetzt wurden. Eine Sorbentmenge von 50 mg P(CAP\_2Vpy) war nicht ausreichend, da mit den ersten zwei Millilitern Acetonitril 58,2% des aufgetragenen Chloramphenicols eluierten. Dienten als Sorbent die NIPs P(MAA) oder P(2Vpy) oder das MIP P(CAP\_MAA) wurden mehr als 84% des Chloramphenicols mit dem ersten Milliliter Waschlösung eluiert (Beurteilung der Ergebnisse siehe Abschnitt 4.1.2.4.).

Die Tabelle 4-15 zeigt die Chloramphenicol-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion mit Acetonitril als Waschlösung in Abhängigkeit von der Konzentration.

Tab. 4-15: Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Chloramphenicol-Lösungen verschiedener Konzentration auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril als Waschlösung

c <sub>CAP</sub> (nmol/ Probenvolumen)	CAP-Wiederfindung (%)					
	2,5	5	10	20	50	100
<b>1. Probe</b>	98,4	100,1	99,0	87,0	83,5	65,5
<b>2. Probe</b>	97,0	97,63	99,1	92,4	83,4	62,4
<b>3. Probe</b>	98,2	99,8	99,1	92,5	83,6	63,7
<b>4. Probe</b>	98,2	98,5	99,9			
<b>5. Probe</b>	98,8	99,0	98,9			
<hr/>						
<b>MW</b>	98,1	99,0	99,2	90,7	83,5	63,9
<b>STDABW</b>	0,67	1,00	0,42	3,15	0,08	1,59

SPE-Bedingungen: Chloramphenicol gelöst in 100 µl Acetonitril; Kartusche gepackt mit 100 mg P(CAP\_2VPy); Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril; Waschen mit 1 ml Acetonitril; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Betrag die aufgebrauchte Chloramphenicol-Menge zwischen 2,5 nmol und 10 nmol, konnten Wiederfindungen von annähernd 100% erreicht werden, wobei diese mit Standardabweichungen kleiner 1 reproduzierbar waren. Dagegen ergaben Chloramphenicol-Mengen größer 10 nmol verminderte Wiederfindungen (Beurteilung der Ergebnisse siehe Abschnitt 4.1.2.4.).

### 4.1.2.4. Waschen mit Ethylacetat

Die Tabelle 4-16 enthält die Chloramphenicol-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion, wobei mit Ethylacetat gewaschen wurde. Ethylacetat ist als Waschlösung im Hinblick auf die Anwendung zur Aufreinigung von Honig- oder Propolisproben von Interesse (Abschnitt 4.1.2.5.).

Tab. 4-16: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (2,5 nmol/100 µl) unter Verwendung von Ethylacetat als Waschlösung

Kartuschen-Füllung	Polymer	CAP-Wiederfindung (%)					Summe
		1. Waschen (1 ml)	2. Waschen (1 ml)	3. Waschen (1 ml)	4. Waschen (2 ml)	Elution	
50 mg	P(CAP_2VPy)	0,0	0,0	4,6	40,6	<b>53,7</b>	98,9
	P(2VPy)	61,0	29,0		8,3	<b>0,9</b>	99,3
	P(CAP_MAA)	91,9	4,2		1,0	<b>1,7</b>	98,7
	P(MAA)	97,1	2,0		0,0	<b>0,5</b>	99,5
100 mg	P(CAP_2VPy)	0,0	0,0	0,0	1,0	<b>98,9</b>	99,9
	P(2VPy)	0,6	50,6		45,6	<b>2,7</b>	99,6
	P(CAP_MAA)	81,2	4,5		10,2	<b>4,8</b>	100,7
	P(MAA)	90,9	6,6		1,2	<b>1,1</b>	99,8

SPE-Bedingungen: 2,5 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl Ethylacetat; Kartuschen gepackt mit 50 mg oder 100 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Ethylacetat; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Bei der Festphasenextraktion auf 100 mg des Polymers P(CAP\_2VPy) wurde nach Waschen mit 5 ml Ethylacetat eine Chloramphenicol-Wiederfindung von 98,9% erreicht. Mit den NIPs sowie dem MIP P(CAP\_MAA) als SPE-Sorbent umfassten die Chloramphenicol-Wiederfindungen weniger als 5%, nachdem mit 5 ml Ethylacetat gewaschen wurde. Mit einer Kartuschenbefüllung von 50 mg P(CAP\_2VPy) betrug die Chloramphenicol-Wiederfindung nur 53,7%.

Die ermittelten Wiederfindungen, nachdem mit Acetonitril oder Ethylacetat gewaschen wurde, stehen im Einklang mit den Ergebnissen der HPLC-Analysen (Abschnitt 4.1.1.1.). Dabei zeigten die NIPs und das P(CAP\_MAA) unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase nur eine geringe Chloramphenicol-Retention. Auf dem P(CAP\_2VPy) konnte dagegen mit einem Retentionsfaktor von 58,65 eine hohe Chloramphenicol-Retention erzielt werden. Der Vergleich von Acetonitril und Ethylacetat als Waschlösung zeigte, dass das Retentionsvermögen des P(CAP\_2VPy) in Ethylacetat größer war als in Acetonitril. Da Ethylacetat apolarer als Acetonitril ist, begünstigte es die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Das Retentionsvermögen war während der Festphasenextraktion mit Acetonitril oder Ethylacetat geringer als mit Acetonitril/Wasser-

oder Methanol/Wasser-Mischungen. Dies wird durch die Retentionsfaktoren, die durch die HPLC-Analysen (Abschnitt 4.1.1.1.) ermittelt wurden, verdeutlicht. Der Retentionsfaktor des Chloramphenicols auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) und der mobilen Phase Acetonitril betrug 58,65. Dagegen wurde mit den Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil größer 95% hatten und Methanol/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil größer 85% hatten, Retentionsfaktoren größer 100 ermittelt (siehe Anhang A1). Deshalb war es notwendig, mit apolaren Lösemitteln die Bedingungen zur Festphasenextraktion anzupassen, so dass die Kartuschenfüllung von 50 mg auf 100 mg Polymer erhöht und das Volumen der Waschlösung von 5 ml auf 1 ml Acetonitril bzw. 3 ml Ethylacetat verringert wurden (Abschnitt 4.1.2.5.).

Die Tabelle 4-17 zeigt die Chloramphenicol-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion mit Ethylacetat als Waschlösung in Abhängigkeit von der Konzentration.

Tab. 4-17: Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Chloramphenicol-Lösungen verschiedener Konzentration auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) unter Verwendung von Ethylacetat als Waschlösung

c CAP (nmol/ Probenvolumen)	CAP-Wiederfindung (%)						
	2,5	5	10	15	20	50	100
<b>1. Probe</b>	98,4	101,2	99,4	100,2	91,2	84,3	69,7
<b>2. Probe</b>	96,9	98,1	100,6	99,7	92,8	84,4	67,3
<b>3. Probe</b>	99,2	97,4	96,9	99,2	96,2	84,8	68,9
<b>4. Probe</b>	97,7	99,9	97,3	98,6			
<b>5. Probe</b>	98,7	97,8	97,3	96,7			
<b>MW</b>	98,2	98,9	98,3	98,9	93,4	84,5	68,6
<b>STDABW</b>	0,88	1,61	1,60	1,35	2,52	0,26	1,25

SPE-Bedingungen: Chloramphenicol gelöst in 100 µl Ethylacetat; Kartusche gepackt mit 100 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Ethylacetat; Waschen mit 3 ml Ethylacetat; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Betrag die aufgebrauchte Chloramphenicol-Menge zwischen 2,5 nmol und 15 nmol, konnten Wiederfindungen von annähernd 100% erreicht werden, wobei diese mit

Standardabweichungen kleiner 1,6 reproduzierbar waren. Dagegen ergaben Chloramphenicol-Mengen größer 15 nmol verminderte Wiederfindungen.

Die Konzentration des Analyten ist für die Wiederfindung von Bedeutung, da ein MIP eine bestimmte Anzahl molekularer Abdrücke besitzt und somit dessen Kapazität, den Zielanalyten selektiv an die molekularen Abdrücke zu binden, begrenzt ist. Die verwendeten 100 mg MIP enthielten molekulare Abdrücke des Chloramphenicols, die theoretisch der Menge von 7,8 µmol Chloramphenicol entsprachen (siehe nachstehende Berechnung und Abschnitt 3.2.2.). Dies verdeutlicht jedoch auch die geringe Kapazität von MIPs.

$$\text{molekulare Abdrücke in 100 mg MIP} = \frac{420 \text{ µmol Templat} \times 100 \text{ mg SPE-Sorbent}}{5400 \text{ mg Polymer}} = 7,8 \text{ µmol}$$

In der Tabelle 4-18 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen an Wasser oder Methanol im Ethylacetat, das als Waschlösung diente, auf die Chloramphenicol-Wiederfindung auswirkten.

Tab. 4-18: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (2,5 nmol/100 µl) auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) unter Verwendung von Ethylacetat, das geringe Mengen an Methanol oder Wasser enthielt, als Waschlösung

	CAP-Wiederfindung (%)					
Waschlösung (v/v)	1. Waschen (1 ml)	2. Waschen (1 ml)	3. Waschen (1 ml)	4. Waschen (2 ml)	Elution	Summe
<b>EtAc : H<sub>2</sub>O</b>						
<b>99 : 1</b>	92,8	0,7	1,0	1,7	<b>1,8</b>	98,0
<b>EtAc : MeOH</b>						
<b>99 : 1</b>	0,0	1,6	0,8	91,3	<b>6,2</b>	99,9
<b>95 : 5</b>	64,5	31,3	0,7	1,1	<b>2,0</b>	99,7
<b>90 : 10</b>	86,9	5,6	2,4	1,4	<b>1,7</b>	98,0

SPE-Bedingungen: 2,5 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl Ethylacetat; Kartusche gepackt mit 100 mg P(CAP\_2VPy); Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Ethylacetat; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.



Durch den Zusatz von 1% Wasser zum Ethylacetat wurde die Elutionskraft der Waschlösung derartig erhöht, dass mit dem ersten Milliliter Waschlösung 92,8% des Chloramphenicols von der Kartusche eluierten. Der Zusatz von Methanol zum Ethylacetat bewirkte ebenfalls eine Elution des Chloramphenicols während des Waschens. Allerdings betrug der Verlust an Chloramphenicol nach 3 ml Ethylacetat, das 1% Methanol enthielt, nur 2,4%. Die Wasser- bzw. Methanol-Zusätze zum Ethylacetat störten die Wasserstoffbrückenbindungen, auf denen die Retention des Chloramphenicols beruhte, so dass die Wiederfindung nach Elution mit Methanol weniger als 7% betrug. Folglich muss bei der Festphasenextraktion von Chloramphenicol, die auf Wasserstoffbrückenbindungen beruht, darauf geachtet werden, dass die aufzubringenden Proben und Waschlösungen kein Wasser oder Methanol enthalten.

### **4.1.2.5. Festphasenextraktion von Honigproben**

In den vorherigen Abschnitten 4.1.2.2. bis 4.1.2.4. wurden zur manuellen Festphasenextraktion Chloramphenicol-Lösungen, die keine Matrix enthielten, als Proben verwendet. In Hinblick auf die Anwendung der MIPs als Sorbent in der Festphasenextraktion zur weitgehenden Abtrennung der komplexen Matrix bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung des Chloramphenicols aus beispielsweise verschiedenen Bienenprodukten sind in der Tabelle 4-19 die mittels RP18-HPLC-Analyse ermittelten Chloramphenicol-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion der mit Chloramphenicol versetzten Honigproben dargestellt (siehe Abschnitt 3.2.7.1.).

Tab. 4-19: Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Honigproben, denen Chloramphenicol zugesetzt wurde

	CAP-Wiederfindung (%)				
Polymer	P(CAP_2VPy)				P(CAP_MAA)
Waschlösung	Ethylacetat (3 ml)	Ethylacetat (3 ml)	Acetonitril (1 ml)	MeOH:H <sub>2</sub> O (5:95; v/v) (5 ml)	MeOH:H <sub>2</sub> O (5:95; v/v) (5 ml)
Probe	1 g Honig + 5 nmol CAP	1 g Honig + 10 nmol CAP	1 g Honig + 5 nmol CAP	1 g Honig + 100 nmol CAP	1 g Honig + 100 nmol CAP
1	91,4	92,3	56,0	89,9	92,1
2	90,6	88,8	63,5	92,8	91,3
3	91,0	88,7	71,6	89,0	90,9
4		92,0	63,4	90,5	92,8
5		91,8	58,5	91,2	89,6
MW	91,0	90,7	62,6	90,7	91,3
STDABW	0,39	1,79	5,97	1,44	1,20

SPE-Bedingungen: 1g aufgearbeitete Honigprobe (siehe Abschnitt 3.2.7.1.) + Chloramphenicol gelöst in 1 ml Ethylacetat, 1 ml Acetonitril oder 1 ml MeOH:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartusche gepackt mit 100 mg (AcN; EtAc) oder 50 mg (MeOH:H<sub>2</sub>O) Polymer; Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Ethylacetat oder 2 ml Acetonitril oder 2 ml Methanol und 2 ml Wasser; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Diente als Sorbent P(CAP\_2VPy) oder P(CAP\_MAA) und als Waschlösung 3 ml Ethylacetat oder 5 ml Methanol/Wasser (5:95; v/v) betrug die Chloramphenicol-Wiederfindung aus Honigproben ungefähr 90%, wobei die Standardabweichungen zwischen 0,39 und 1,79 lagen. Nach Waschen mit 1 ml Acetonitril lag die Wiederfindung nur bei 60%. Offensichtlich wurde die Chloramphenicol-Wiedererkennung durch die Matrix gestört. Dadurch war die Retention in Acetonitril, welches das geringste Retentionsvermögen der hier eingesetzten Waschlösungen aufwies, nicht ausreichend.

In der Tabelle 4-20 sind die Chloramphenicol-Wiederfindungen aus Honigproben dargestellt, nachdem mit verschiedenen Methanol/Wasser-Mischungen während der Festphasenextraktion gewaschen wurde.

Tab. 4-20: Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Honigproben, denen Chloramphenicol (100 nmol) zugesetzt wurde, unter Verwendung von verschiedenen Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösung

MeOH : H <sub>2</sub> O (v/v)	CAP-Wiederfindung (%)	
	P(CAP_2VPy)	P(CAP_MAA)
<b>20 : 80</b>	92,8	89,1
<b>10 : 90</b>	92,9	94,5
<b>5 : 95</b>	90,7	91,3
<b>0 : 100</b>	91,9	94,2

SPE-Bedingungen: 1 g aufgearbeitete Honigprobe (siehe Abschnitt 3.2.7.1.) + 100 nmol Chloramphenicol gelöst in 1 ml MeOH:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartusche gepackt mit 50 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser; Waschen mit 5 ml Waschlösung; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Die nach Festphasenextraktion ermittelten Chloramphenicol-Wiederfindungen, wobei verschiedene Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösung verwendet wurden, lagen zwischen 89,1% und 94,5%. Somit konnte in der hier dargestellten manuellen MIP-SPE die Methanol/Wasser-Mischungen bis 20% Methanol enthalten, ohne an Wiederfindung einzubüßen.

Die Abbildungen 4-9 und 4-10 zeigen Chromatogramme, die nach Festphasenextraktion von Honigproben auf dem Sorbent P(CAP\_2VPy) und Analyse mittels RP18-HPLC erhalten wurden. Dabei diente als Waschlösung Ethylacetat (Abb. 4-9) oder eine Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) (Abb. 4-10). Die Chromatogramme 4-9 A und 4-10 A zeigen die Elutionsfraktionen von Honigproben, die mit Chloramphenicol versetzt wurden. Dagegen zeigen die Chromatogramme 4-9 B und 4-10 B die Elutionsfraktionen von Honigproben ohne Chloramphenicol-Zusatz. Die Chromatogramme 4-9 C und 4-10 C stellen die eluierten SPE-Waschlösungen dar.

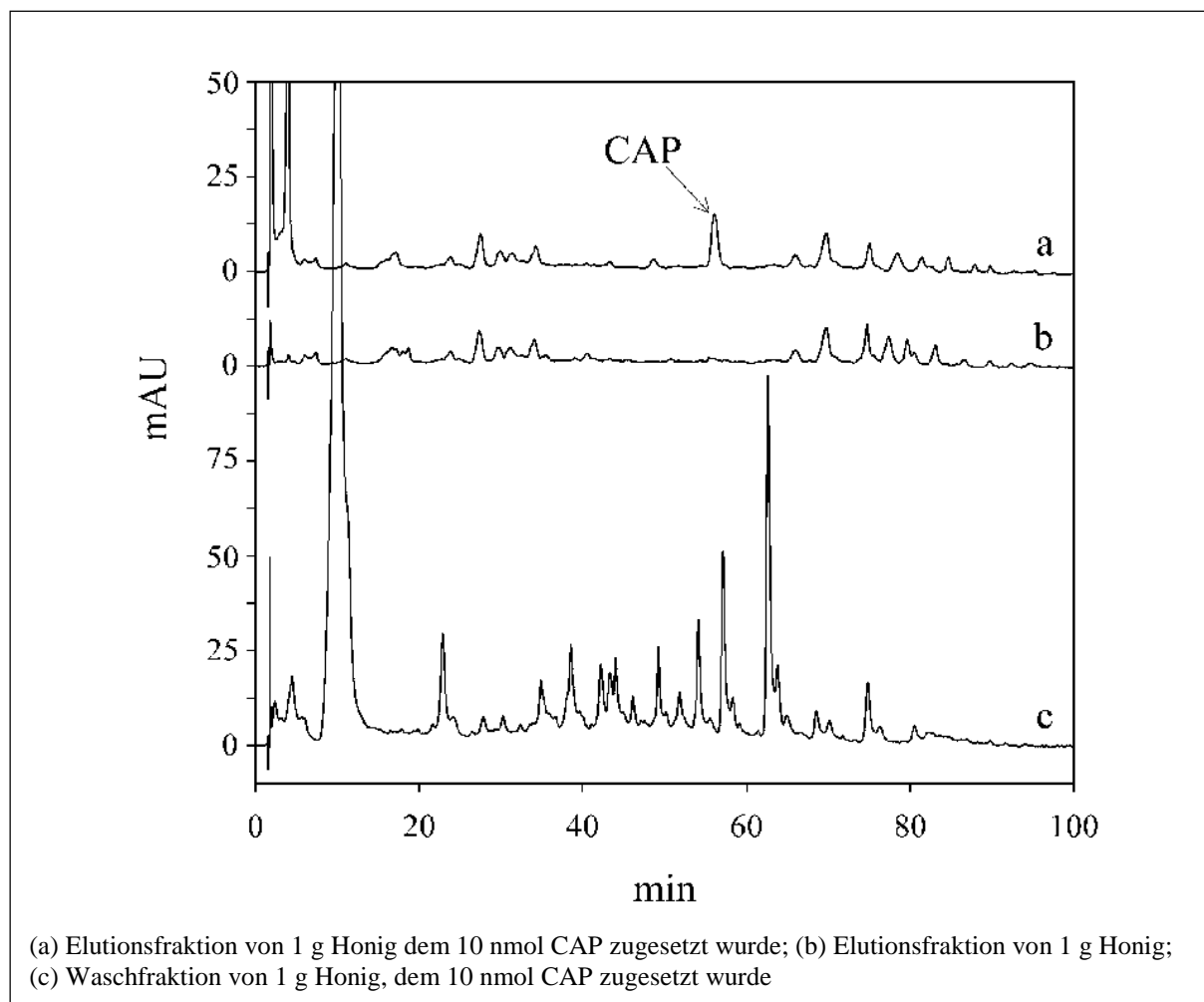


Abb. 4-9: Chromatogramme (RP18-HPLC) erhalten nach Festphasenextraktion (Waschen mit 5 ml Ethylacetat) von Honigproben auf dem Sorbent P(CAP\_2VPy) (SPE- und HPLC-Bedingungen siehe Tab. 4-19)

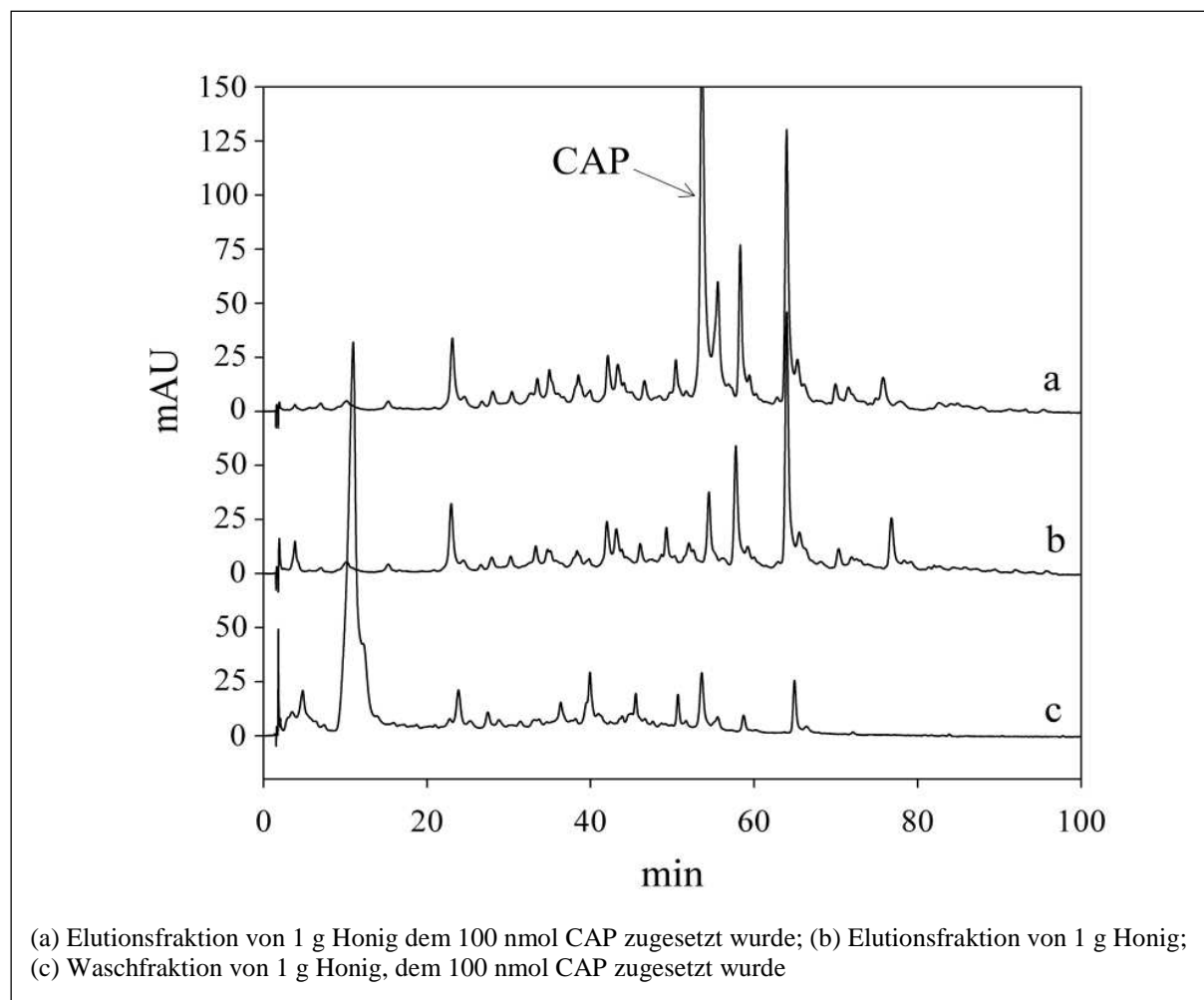


Abb. 4-10: Chromatogramme (RP18-HPLC) erhalten nach Festphasenextraktion (Waschen mit 5 ml Methanol/Wasser (5:95; v/v)) von Honigproben auf dem Sorbent P(CAP\_2VPy) (SPE- und HPLC-Bedingungen siehe Tab. 4-19)

Mit Ethylacetat als Waschlösung konnte ein höherer Anteil der Honigmatrix von der Kartusche während des Waschschrtes eluiert werden als mit der Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v). Daher konnte nach Waschen mit Ethylacetat der Chloramphenicol-Peak unter den gegebenen Analysebedingungen mittels RP18-HPLC und UV-Detektion bis zur Basislinientrennung von der Matrix separiert werden. Nach Waschen mit der Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) war das nicht möglich. Die bessere Abtrennung der Matrix vom Chloramphenicol, wenn mit Ethylacetat gewaschen wurde, weist auf eine stärkere Wechselwirkung des Chloramphenicols, auf Grund der selektiven Wasserstoffbrückenbindungen, an das Polymer P(CAP\_2VPy) hin.

##### 4.1.2.6. Zusammenfassende Betrachtung

Die durch RP18-HPLC-Analyse ermittelte Chloramphenicol-Bestimmungsgrenze von 1,1 nmol/ml (350 µg/l) ist um den Faktor 1000 größer als die gesetzlich geforderte Mindestleistungsgrenze von 0,3 µg/kg (Richtlinie 96/23/EG). Die in der Literatur angegebenen Nachweisgrenzen sind ebenfalls nicht ausreichend um die Mindestleistungsgrenze zu erfüllen (Abschnitt 2.2.5.). Weiterhin ist die von Levi et al. (1997) und McNiven et al. (1998) angegebene Nachweisgrenze von 5 µg/ml fünfzig mal höher als die in dieser Arbeit ermittelten Nachweisgrenze von 0,1 µg/ml. Die Nachweisgrenze nach Suárez-Rodríguez und Díaz-García (2001) ist mit 8 µg/ml sogar um das achtzigfache höher. Mena et al. (2003) erreichten mit einem Wert von 0,015 µg/ml eine um das 6,7fache und das MIP[4]SPE<sup>TM</sup>CAP (MIP Technologies AB, Lund, Schweden) mit einem Wert von 0,01 µg/ml eine um das 10fache niedrigere Nachweisgrenze.

Die Festphasenextraktion von Chloramphenicol-Lösungen ergab, dass die Elutionskraft der wässrigen Waschlösungsmischungen mit zunehmenden Methanol-, Acetonitril- oder Ethylacetat-Gehalt größer wurde. Dies verdeutlicht, dass apolarere Lösemittel in Wasser die nicht selektiven hydrophoben Wechselwirkungen des Chloramphenicols mit der Polymermatrix verringerten. Die bei der Festphasenextraktion als Sorbent eingesetzten Polymere P(CAP\_2VPy), P(2VPy), P(CAP\_MAA) und P(MAA) zeigten nur geringfügige Unterschiede bei der Festphasenextraktion vom Chloramphenicol unter Verwendung wässriger Lösemittelmischungen als Waschlösung. Diente als Waschlösung Ethylacetat konnte nur mit dem Polymer P(CAP\_2VPy) eine Wiederfindung von annähernd 100% beobachtet werden. Unter Verwendung der NIPs und des P(CAP\_MAA) als SPE-Sorbent waren die Chloramphenicol-Wiederfindungen kleiner 5% nachdem mit Ethylacetat gewaschen wurde. Da die Chloramphenicol-Retention auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen beruhte, bewirkte der Zusatz von Wasser oder Methanol zum Ethylacetat eine Elution des Chloramphenicols während des Waschschrilles. Weiterhin ergaben Chloramphenicol-Mengen größer 15 nmol verminderte Wiederfindungen, wenn Ethylacetat als Waschlösung diente. Konzentrationen (20, 50 und 100 nmol/Probe) höher als 15 nmol/Probe sind für die Analyse von beispielsweise Honigproben nicht von Bedeutung, da die gesetzlich geforderte Mindestleistungsgrenze 0,3 µg/kg (1 pmol/g Probe) beträgt (Richtlinie 96/23/EG).

Die in dieser Arbeit ermittelten Chloramphenicol-Wiederfindungen aus Honigproben nach Festphasenextraktion von über 90% überstiegen die angegebene Wiederfindung der MIP[4] SPE<sup>TM</sup> CAP-Kartuschen (MIP Technologies AB, Lund, Schweden) und entsprachen in der Höhe den Wiederfindungen von Mena et al. (2003) (siehe auch Abschnitt 2.2.5.). Die Produktbeschreibung der MIP[4] SPE<sup>TM</sup> CAP-Kartuschen von MIP Technologies AB (Lund, Schweden), die zur Festphasenextraktion von Chloramphenicol aus Milch oder Milchpulver eingesetzt werden können, gibt eine Wiederfindung von größer 80% an. Mena et al. (2003) entwickelten ebenfalls eine Festphasenextraktion von Chloramphenicol zur Probenreinigung und Analytenanreicherung mit anschließender voltammetrischer Detektion, wobei zur Polymersynthese Chloramphenicol als Templat, DEAEMA als funktionelles Monomer, EDMA als Quervernetzer und Tetrahydrofuran als Porogen verwendet wurde. Diese erreichten beispielsweise für Vollmilchproben Wiederfindungen von  $90 \pm 11\%$ . Weiterhin wurde gezeigt, dass mit Ethylacetat als Waschlösung ein höherer Anteil der Honigmatrix von der Kartusche während des Waschschrilles eluiert werden kann als mit der Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v). Die bessere Abtrennung der Matrix vom Chloramphenicol, wenn mit Ethylacetat gewaschen wurde, weist auf eine stärkere Wechselwirkung des Chloramphenicols, auf Grund der selektiven Wasserstoffbrückenbindungen, an das Polymer P(CAP\_2VPy) hin. Die Festphasenextraktionen auf den MIP[4] SPE<sup>TM</sup> CAP-Kartuschen von MIP Technologies AB (Lund, Schweden) sowie bei der entwickelten Methode von Mena et al. (2003) erfolgte dagegen im wässrigen Milieu, so dass diese Extraktionen überwiegend auf nicht selektiven hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.

#### 4.1.3. Online-SPE-LC-MS/MS

Die Chloramphenicol-Quantifizierung nach manueller Festphasenextraktion mittels RP18-HPLC und anschließender UV-Detektion bei 275 nm war durch die Bestimmungsgrenze, die 1,1 nmol/ml (350 µg/l) betrug, eingeschränkt (Abschnitt 4.1.2.1.). Die gesetzlich geforderte Mindestleistungsgrenze liegt bei 0,3 µg/kg und ist somit um den Faktor 1000 kleiner (Richtlinie 96/23/EG). Daher sollten für zukünftige Anwendungen, wie im folgenden Abschnitt dargestellt, eine MS/MS als Detektionssystem verwendet werden (Abschnitt 3.2.6.). Weiterhin erfolgte die Probenaufreinigung und –aufkonzentrierung mittels einer online-

Festphasenextraktion, da eine manuelle Festphasenextraktion einen höheren Lösemittelverbrauch hat sowie eines höheren Zeit- und Personalaufwandes bedarf. Mittels der von Grotewahl (2006) entwickelten Methode zur Chloramphenicol-Bestimmung unter Verwendung einer online-SPE-LC-MS/MS wird die Mindestleistungsgrenze erfüllt. Jedoch ist die Chloramphenicol-Quantifizierung aus komplexen Matrices, wie beispielsweise Honig oder Propolis, durch die ungenügende Abtrennung der Matrix während der online-Festphasenextraktion auf einem RP18-Material und Waschen mit einer Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) beeinträchtigt. Um eine selektivere Festphasenextraktion und daraus folgend eine bessere Abtrennung von Matrix zu erreichen, wurde das zur online-Festphasenextraktion verwendete RP18-Material durch ein MIP bzw. NIP ersetzt.

#### 4.1.3.1. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen

In der Tabellen 4-21 sind die Chloramphenicol-Wiederfindungen aus einer Standardlösung nach online-SPE-LC-MS/MS dargestellt, wobei als SPE-Sorbent MIPs bzw. ein NIP verwendet wurde und als Waschlösung während der online-Festphasenextraktion verschiedene Methanol/Wasser-Mischungen dienten.

Tab. 4-21: Wiederfindung nach online-SPE-LC-MS/MS einer Chloramphenicol/Chloramphenicol-d5-Standardlösung (1 µg/kg) unter Verwendung verschiedener Methanol/Wasser-Mischungen als SPE-Waschlösung und MIPs bzw. NIP als SPE-Sorbent

Polymer	CAP-Wiederfindung (%)					
	P(CAP_2VPy)		P(CAP_MAA)		P(MAA)	
	CAP	CAP d5	CAP	CAP d5	CAP	CAP d5
<b>MeOH:H<sub>2</sub>O (v/v)</b>						
<b>20 : 80</b>	6,1	5,3				
<b>15 : 85</b>	19,3	13,1				
<b>10 : 90</b>	35,7 ± 2,45	33,8 ± 0,21				
<b>5 : 95</b>	72,0 ± 4,73	63,8 ± 3,27	67,8 ± 4,53	66,1 ± 2,34	59,1 ± 4,44	57,7 ± 0,46
<b>0 : 100</b>	127,8 ± 1,89	102,8 ± 6,94				

SPE-Bedingungen: Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5 gelöst in Wasser; Kartuschen gepackt mit 20 mg Polymer; Elution mit Methanol; Bedingungen der online-SPE-LC-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.; MW±STDW (n = 2)



Diente Wasser als Waschlösung während der online-Festphasenextraktion auf dem Polymer P(CAP\_2VPy), wurde deutlich mehr als 100% des aufgetragenen Chloramphenicols eluiert. Dies deutet auf die Problematik der Templatausblutung, die in der Tabelle 4-22 ausführlicher dargestellt ist, und der daraus folgenden Überschätzung der Ergebnisse hin. Die Wiederfindung des Chloramphenicols-d5 wurde nicht von den Templatausblutungen gestört, da bei der Polymersynthese nur Chloramphenicol als Templat diente (siehe Abschnitt 3.2.2.). Somit waren die Wiederfindungen des Chloramphenicols-d5 geringer als die des Chloramphenicols, so dass unter Verwendung von Wasser als Waschlösung die Chloramphenicol-d5-Wiederfindung annähernd 100% betrug. Da Chloramphenicol-d5 als interner Standard bei der Analyse von Proben verwendet wurde, war dessen Retention ebenfalls von Bedeutung. Entsprechend der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1.1.1. und 4.1.2.2. erhöhte sich die Elutionskraft der Waschlösung gegenüber den Zielanalyten Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5 mit ansteigendem Methanol-Anteil, so dass die Wiederfindungen abnahmen. Allerdings bewirkte schon die Zugabe von 5% Methanol zum Wasser eine deutliche Verringerung der Wiederfindung von Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5 auf allen getesteten Polymeren. Bei der manuellen Festphasenextraktion wurde dagegen bis zu einem Methanol-Anteil von 20% in der Methanol/Wasser-Mischung eine Chloramphenicol-Wiederfindung von annähernd 100% erreicht. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass bei der manuellen Festphasenextraktion 50 mg bei der online-Festphasenextraktion aber nur 20 mg Polymer eingesetzt wurden.

In der Tabelle 4-22 ist die Problematik der Templatausblutung während der online-Festphasenextraktion dargestellt.

Tab. 4-22: Darstellung der Templatausblutungen aus dem MIPs bzw. NIP, die als SPE-Sorbent dienten, während drei aufeinanderfolgenden Analysen mit der online-SPE-LC-MS/MS unter Verwendung einer Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) als SPE-Waschlösung

		CAP-Wiederfindung (%)					
Polymer		P(CAP_2VPy)		P(CAP_MAA)		P(MAA)	
Analyse	Probe	CAP	CAP d5	CAP	CAP d5	CAP	CAP d5
1	CAP-Standard	79,0	60,0	71,1	67,8	55,9	50,1
2	Wasser	18,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	Wasser	19,9	0,0				
Summe		117,3	60,0	71,1	67,8	55,9	50,1

SPE-Bedingungen: Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5 gelöst in Wasser; Kartuschen gepackt mit 20 mg Polymer; Elution mit Methanol; Bedingungen der online-SPE-LC-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.

Nachdem ein Chloramphenicol-Standard auf die online-SPE-Kartusche aufgebracht wurde, wurde in der folgenden Analyse reines Wasser injiziert. Dennoch wurde Chloramphenicol von der SPE-Kartusche eluiert, wenn diese mit dem MIP P(CAP\_2VPy) gepackt war. Dabei überschritt die gesamte eluierte Chloramphenicol-Menge die aufgebrachte Chloramphenicol-Menge, so dass das eluierte Chloramphenicol in der zweiten und dritten Analyse aus der Matrix des P(CAP\_2VPy) stammen musste. Diente das MIP P(CAP\_MAA) oder das NIP P(MAA) als Sorbent bei der online-Festphasenextraktion, wurde in der zweiten Analyse, bei der nur Wasser als Probe aufgebracht wurde, kein Chloramphenicol detektiert. Bei der Synthese des NIPs P(MAA) wurde kein Templat eingesetzt, so dass in der Polymermatrix keine Templatreste vorhanden sein konnten. Bei dem MIP P(CAP\_MAA), das wie das Polymer P(CAP\_2VPy) mit dem Templat Chloramphenicol geprägt wurde, traten keine Templatausblutungen auf bzw. die Templatausblutungen waren geringer als beim P(CAP\_2VPy), so dass diese unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Auf Grund der Templatausblutungen, insbesondere auf dem P(CAP\_2VPy), waren die Chloramphenicol-Wiederfindungen auf den MIPs fälschlicherweise zu hoch. Chloramphenicol-d5 wurde in der zweiten und dritten Analyse nicht eluiert, da dieses nicht als Templat während der Polymersynthese diente.

Die Abbildungen 4-11 und 4-12 zeigen Chromatogramme, die nach online-Festphasenextraktion einer Propolisprobe, die eine komplexe Matrix aufweist, und anschließender Analyse mittels LC-MS/MS erhalten wurden. Als online-SPE-Sorbent diente das MIP P(CAP\_2VPy) (Abb. 4-11) oder ein herkömmliches RP18-Material (Abb. 4-12).

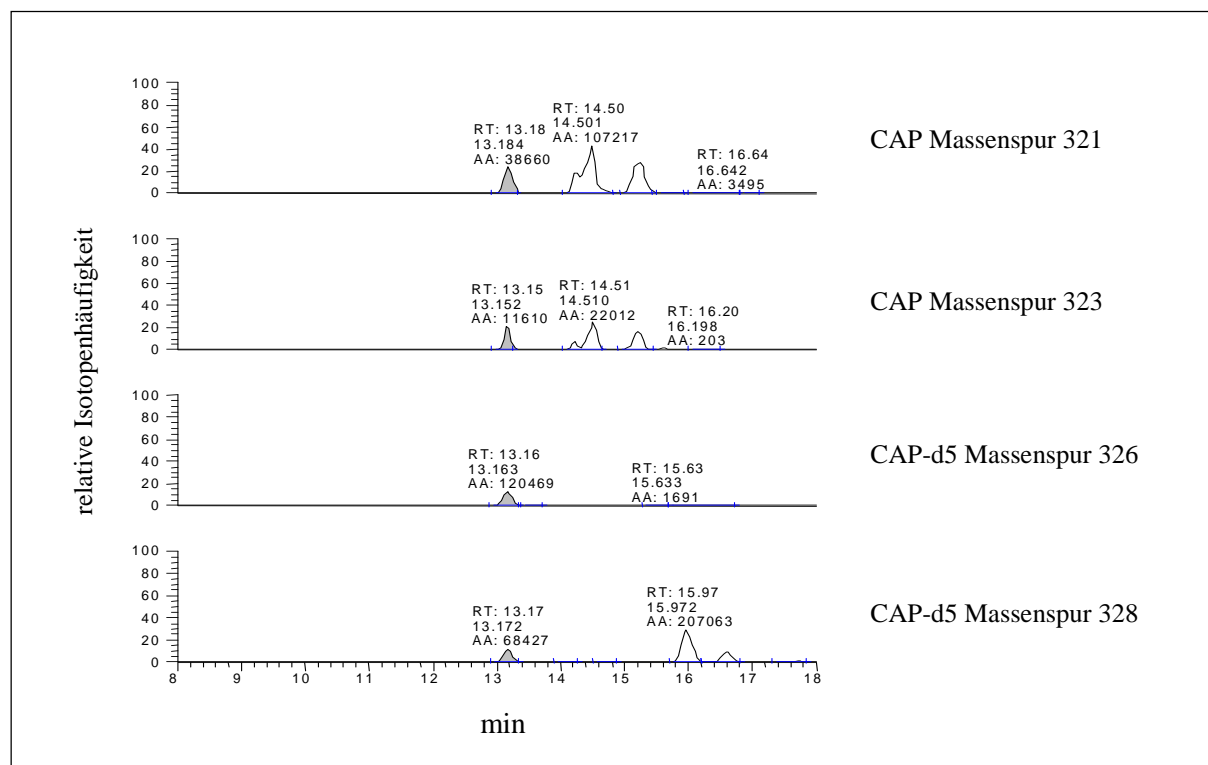


Abb. 4-11: Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit Chloramphenicol unbelasteten Propolisprobe, wobei als SPE-Sorbent P(CAP\_2VPy) und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente (schraffierter Peak = Chloramphenicol bzw. Chloramphenicol-d5); Bedingungen der online-SPE-LC-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.

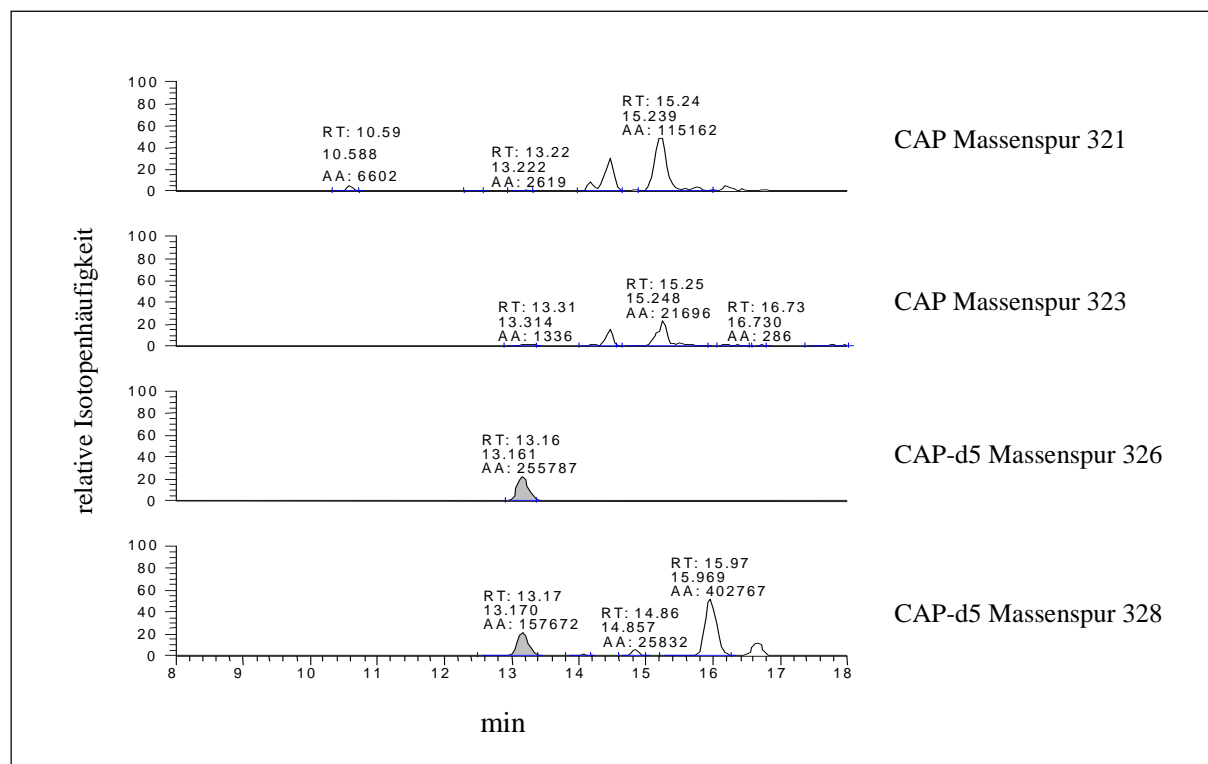


Abb. 4-12: Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit Chloramphenicol unbelasteten Propolisprobe, wobei als online-SPE-Sorbent ein RP18-Material und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente (schraffierter Peak = Chloramphenicol bzw. Chloramphenicol-d5); Bedingungen der online-SPE-LC-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.

Wurde mit einer Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) während der online-Festphasenextraktion gewaschen, konnte unter Verwendung des MIPs P(CAP\_2VPy) genauso viel Propolismatrix abgetrennt werden wie mit dem bis dahin verwendeten RP18-Material. Jedoch wurde bei der Analyse der mit Chloramphenicol unbelasteten Propolisprobe das Problem der Templatausblutung deutlich, da nach online-Festphasenextraktion auf dem Sorbent P(CAP\_2VPy) Chloramphenicol detektiert wurde. Diente, wie bei der herkömmlichen Methode (Grotewahl, 2006), als Sorbent bei der online-Festphasenextraktion ein RP18-Material, wurde kein Chloramphenicol in der Propolisprobe detektiert. Folglich muss es sich bei dem detektierten Chloramphenicol um Templatmoleküle handeln, die zur molekularen Prägung während der Polymerisation eingesetzt wurden.

Die Abbildungen 4-13 und 4-14 zeigen Chromatogramme, die nach online-Festphasenextraktion von Honigproben und anschließender Analyse mittels LC-MS/MS erhalten wurden. Als online-SPE-Sorbent diente das NIP P(MAA) (Abb. 4-13) oder ein herkömmliches RP18-Material (Abb. 4-14).

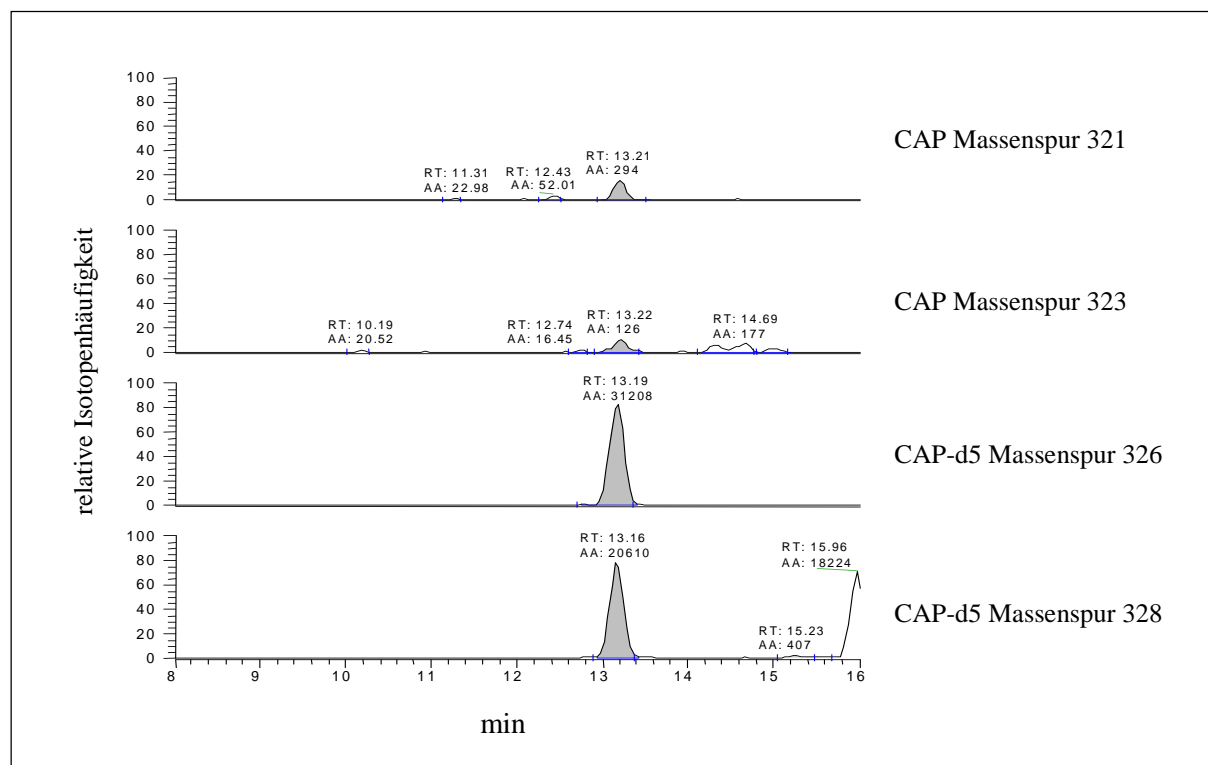


Abb. 4-13: Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit 0,3 µg Chloramphenicol dotierten Honigprobe, wobei als online-SPE-Sorbent P(MAA) und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente (schraffierter Peak = Chloramphenicol bzw. Chloramphenicol-d5); Bedingungen der online-SPE-LC-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.

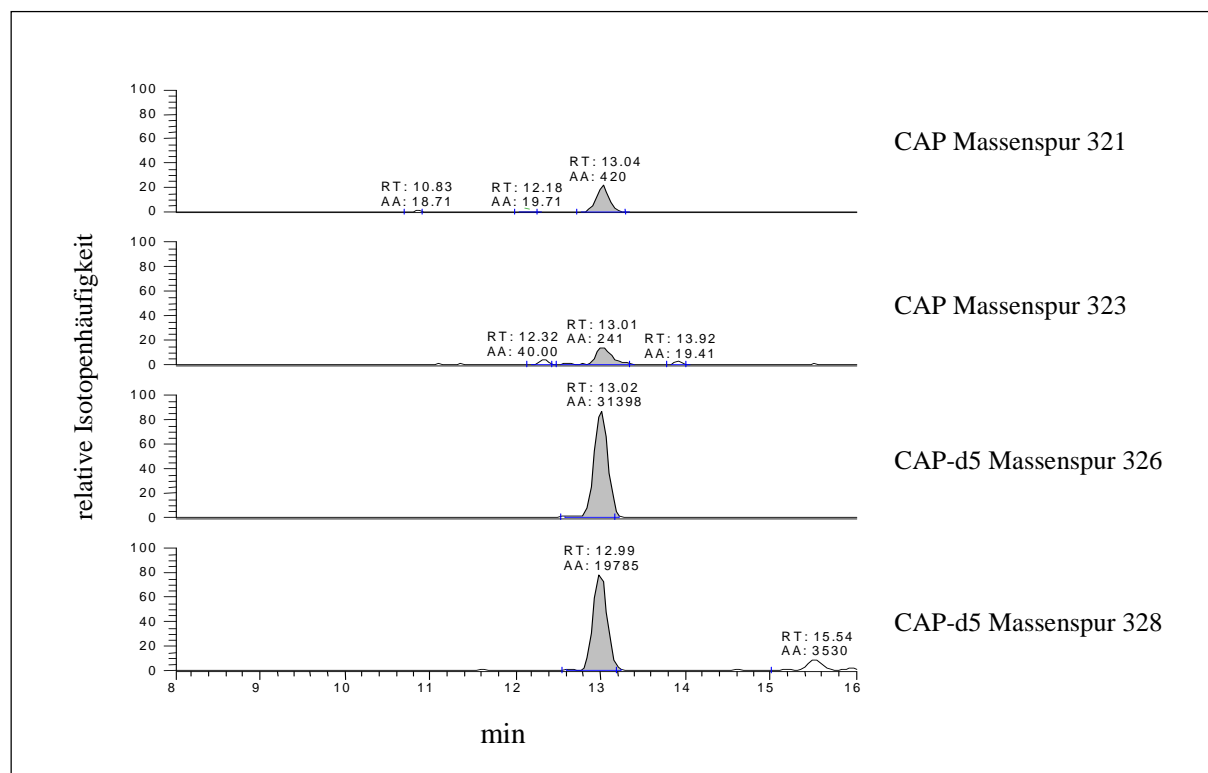


Abb. 4-14: Chromatogramm (online-SPE-LC-MS/MS) einer mit 0,3 µg Chloramphenicol dotierten Honigprobe, wobei als online-SPE-Sorbent ein RP18-Material und als SPE-Waschlösung Methanol/Wasser (5:95; v/v) diente (schraffierter Peak = Chloramphenicol bzw. Chloramphenicol-d5); Bedingungen der online-SPE-LC-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.

Wurde mit einer Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v) während der online-Festphasenextraktion gewaschen, konnte unter Verwendung des NIPs P(MAA) genauso viel Honigmatrix abgetrennt werden wie mit dem bis dahin verwendeten RP18-Material. Da es sich um eine mit Chloramphenicol dotierte Honigprobe handelte, wurde Chloramphenicol detektiert. Das Problem der Templatausblutung besteht unter Verwendung eines NIPs nicht, da dessen Synthese unter Abwesenheit des Templats erfolgt und somit keine Templatrete in der Polymermatrix vorhanden sein können. Demnach ist das NIP als nicht selektives SPE-Sorbent ebenso geeignet wie ein herkömmliches RP18-Material.

#### 4.1.3.2. Waschen mit apolaren Lösemittelmischungen

Die Tabelle 4-23 zeigt die Retention des Chloramphenicols auf einer online-SPE-Kartusche, die mit dem MIP P(CAP\_2VPy) gepackt war. Zur Verkürzung der Analysenzeit wurde die

LC-Trennsäule umgangen, so dass die SPE-Waschlösung, die von der online-SPE-Kartusche eluierte, direkt zur Detektion in die MS/MS geleitet wurde.

Tab. 4-23: Chloramphenicol-Retention (1 µg/kg) auf dem online-SPE-Sorbent P(CAP\_2VPy) unter Verwendung verschiedener Acetonitril-Mischungen als Waschlösung

Waschlösung	CAP-Retention (min)	
	Kartuschendimension 20 x 2 mm (20 mg Polymer)	Kartuschendimension 20 x 4 (80 mg Polymer)
Acetonitril/Wasser (7:3; v/v)	1,28	
Acetonitril	1,04	1,24
Acetonitril/Ethylacetat (1:1; v/v)		1,33

Chloramphenicol gelöst in Acetonitril; Bedingungen der online-SPE-MS/MS siehe Abschnitt 3.2.6.

Diente als Waschlösung bei der online-Festphasenextraktion mit dem Sorbent P(CAP\_2VPy) Acetonitril oder eine Acetonitril/Wasser- bzw. Acetonitril/Ethylacetat-Mischung als Waschlösung, eluierte Chloramphenicol innerhalb der ersten zwei Minuten von der Kartusche. Bei der unter Abschnitt 3.2.6. dargestellten online-Festphasenextraktion betrug der Waschschrift jedoch 4 min. Folglich könnte unter diesen Bedingungen kein Chloramphenicol mittels Festphasenextraktion angereichert und nach Elution mit Methanol detektiert werden. Die Elutionskraft von Acetonitril und der Acetonitril/Ethylacetat-Mischung, in denen Chloramphenicol auf Grund selektiver Wasserstoffbrückenbindungen reteniert wurde, war mit der Elutionskraft von der Acetonitril/Wasser-Mischung, mit der bei der chromatographischen Evaluierung mit einem Retentionsfaktor von 0,53 nur eine sehr geringe Retention erzielt wurde (Abschnitt 4.1.1.1.), vergleichbar. Die Erhöhung des eingesetzten Festphasenextraktionsmaterials, indem eine Kartusche mit größerem Innendurchmesser verwendet wurde, bewirkte mit Acetonitril als Waschlösung keine Verstärkung der Chloramphenicol-Retention. Somit ist Acetonitril als Waschlösung in diesem Format der online-Festphasenextraktion nicht geeignet. Deshalb wurde weiterhin das apolarere Ethylacetat als Waschlösung während der online-Festphasenextraktion getestet. Da die Detektion in Ethylacetat mittels ESI-MS/MS nicht möglich ist, konnte die Waschlösung nach der online-Festphasenextraktion nicht direkt in die ESI-MS/MS geleitet werden. Deshalb wurde erst die Elutionslösung Methanol zur Detektion in die ESI-MS/MS überführt, wobei Chloramphenicol eindeutig detektiert werden konnte. Dies bedeutet, dass Chloramphenicol während des 4-minütigen Waschens mit Ethylacetat nicht vollständig von der online-SPE-Kartusche eluierte, so dass Ethylacetat als Waschlösung während der online-Festphasenextraktion geeignet ist.

### 4.1.3.3. Zusammenfassende Betrachtung

Unter Verwendung von Methanol/Wasser-Mischungen mit einem hohen Wasser-Anteil als Waschlösung wurde eine Retention der Zielanalyten Chloramphenicol und Chloramphenicol-d5 während der online-Festphasenextraktion mit den MIPs oder dem NIP als Sorbent erreicht. Weiterhin zeigte sich, wie auch schon im Abschnitt 4.1.2.2. dargestellt, eine von der Methanol-Konzentration abhängige Störung der hydrophoben Wechselwirkungen. Daher nahm die Elutionskraft der Waschlösung gegenüber der Zielanalyten mit steigendem Methanol-Anteil zu, was zu einer verminderten Wiederfindung nach Elution mit Methanol führte. Darüber hinaus trat auf Grund der niedrigen Detektionsgrenze die Problematik der Templatausblutung während der online-SPE-LC-MS/MS auf, was eine Überschätzung der Chloramphenicol-Wiederfindung zur Folge hatte. In der Literatur wird dieses Problem umgangen, indem als Templat eine zum Zielanalyten strukturähnliche Verbindung verwendet wird, so dass die Templatausblutungen die Quantifizierung nicht stören (Andersson et al., 1997; Möller et al., 2004; Cobb & Andersson, 2005; Watabe et al., 2006). In dieser Arbeit ist die Verwendung von strukturähnlichen Molekülen als Templat, um Templatausblutungen zu vermeiden, im Abschnitt 4.2. dargestellt.

Während der online-Festphasenextraktion einer Propolisprobe mit dem MIP P(CAP\_2VPy) als Sorbent bzw. während der online-Festphasenextraktion einer Honigprobe mit dem NIP P(MAA) als Sorbent wurde im Vergleich zu dem bisher verwendeten RP18-Material als Sorbent eine vergleichbare Abtrennung der Probenmatrix erreicht. Als Waschlösung diente jeweils eine Methanol/Wasser-Mischung (95:5; v/v). Demnach ist das MIP bzw. NIP als nicht selektives SPE-Sorbent ebenso geeignet wie ein herkömmliches RP18-Material. Im Abschnitt 4.1.2.5. wurde gezeigt, dass mit Ethylacetat als Waschlösung ein höherer Anteil der Honigmatrix von der Kartusche, die mit dem MIP P(CAP\_2VPy) gepackt war, während des Waschschruttes eluiert werden konnte als mit der Methanol/Wasser-Mischung (5:95; v/v). Dies ist auf die selektive Retention des Chloramphenicols durch die geprägten Kavitäten zurückzuführen. Im wässrigen Milieu basiert dagegen die Retention überwiegend auf nicht selektiven Wechselwirkungen mit der Polymermatrix. Folglich sollte als Waschlösung während der online-Festphasenextraktion, bei der ein MIP als Sorbent dient, ein apolares Lösemittel, wie beispielsweise Ethylacetat, verwendet werden. Die Untersuchungen mit Ethylacetat deuten darauf hin, dass dieses als Waschlösung während der online-Festphasenextraktion geeignet ist.



## **4.2. Florfenicol und Thiamphenicol geprägte Polymere zur Separation von Chloramphenicol**

Bei der Anwendung der MIPs als Sorbent in einer online-Festphasenextraktion, die mit einer LC-MS/MS gekoppelt war, trat auf Grund der deutlich niedrigeren Nachweisgrenze als bei der vorher verwendeten RP18-HPLC und UV-Detektion das Problem der Templatausblutungen auf (Abschnitt 4.1.3.). Eine Strategie, dieses Problem zu umgehen, besteht darin, zur Polymersynthese ein zum Zielmolekül strukturähnliches Molekül als Templat zu verwenden, so dass die Templatausblutungen die späteren Quantifizierungen des Zielanalytens nicht stören (Wulff, 1995). Als strukturähnliche Moleküle zum Chloramphenicol wurden Florfenicol und Thiamphenicol ausgewählt, bei denen die Nitrogruppe durch eine Methylsulfonylgruppe ersetzt ist. Beim Florfenicol ist zusätzlich eine Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom ersetzt (siehe Abschnitt 2.2.1.). Zur Synthese dieser Bulk-Polymer wurde das funktionelle Monomer 2VPy verwendet, weil, wie im Abschnitt 4.1.1. dargestellt, unter apolaren Bedingungen das größte Retentionsvermögen und der größte Prägungseffekt auf dem mit 2VPy synthetisierten MIP erzielt wurde. Um den Einfluss der molekularen Prägung auf die Wiedererkennungseigenschaften zu verdeutlichen, wurde im nachfolgenden Abschnitt 4.2.1. neben dem Florfenicol bzw. Thiamphenicol geprägten Polymer auch die bereits im Abschnitt 4.1.1. diskutierten Polymere P(CAP\_2VPy) und P(2VPy) betrachtet.

### **4.2.1. Chromatographische Evaluierung**

#### **4.2.1.1. Retention des Chloramphenicols**

##### **4.2.1.1.1. Einfluss der mobilen Phase**

In den Abbildungen 4-15 a – c sind die Retentionsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Chloramphenicols dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den MIPs und dem NIP erzielt wurden.

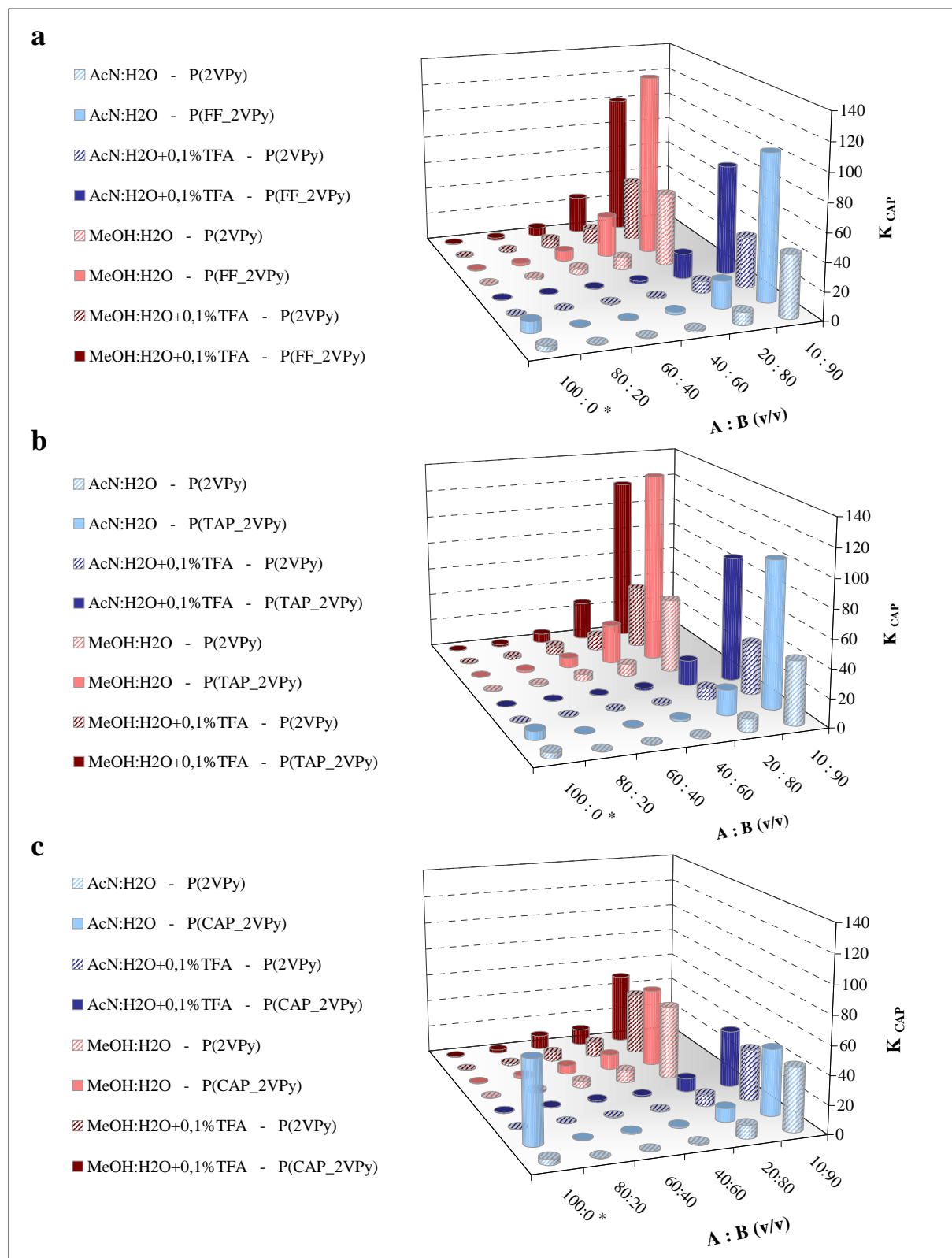


Abb. 4-15: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Chloramphenicols ( $1 \mu\text{mol/ml}$ ; \*  $0,1 \mu\text{mol/ml}$ ) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen ( $A = \text{AcN}$  bzw.  $\text{MeOH}$ ;  $B = \text{H}_2\text{O}$ ) auf den Polymeren, die mit Florfenicol (a), Thiamphenicol (b) oder Chloramphenicol (c) molekular geprägt wurden (Zusatz FF bzw. TAP bzw. CAP kennzeichnet MIP); HPLC-Bedingungen zur Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Auf allen Polymeren konnte eine zunehmende Retention des Chloramphenicols mit ansteigendem Wasser-Gehalt in den Acetonitril/Wasser- sowie Methanol/Wasser-Mischungen ab einem Wasser-Gehalt von 20% festgestellt werden. In einer Acetonitril/Wasser-Mischung mit einem Wasser-Anteil größer 90% oder einer Methanol/Wasser-Mischung mit einem Wasser-Anteil größer 80% wurden mehr als 200 min zur Elution des Chloramphenicols benötigt. Dagegen wurde Chloramphenicol kaum oder gar nicht reteniert, wenn weniger als 70% Wasser in den Acetonitril/Wasser-Mischungen bzw. weniger als 30% Wasser in den Methanol/Wasser-Mischungen enthalten waren. Die Retention des Chloramphenicols verringerte sich in allen getesteten Acetonitril/Wasser- sowie Methanol/Wasser-Mischungen unter Zusatz von 0,1% TFA.

In den Tabelle 4-24 und 4-25 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen Wasser, Methanol oder Säure im Acetonitril auf die Chloramphenicol-Retention auswirkten (siehe Abb. 4-15 a – c).

Tab. 4-24: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren

Polymer	$K_{\text{CAP}} - \text{P(FF\_2VPy)}$			$K_{\text{CAP}} - \text{P(TAP\_2VPy)}$			$K_{\text{CAP}} - \text{P(CAP\_2VPy)}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>mobile Phase v/v</b>									
<b>100 : 0</b>	8,11	0,21		6,14	0,19		58,65	0,55	
<b>99 : 1</b>	5,54	0,38	0,72	4,21	0,40	0,58	4,48	0,67	7,01
<b>95 : 5</b>	0,36	0,38	0,45	0,28	0,28	0,33	0,58	0,57	1,35

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-25: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf dem NIP P(2VPy)

Polymer	$K_{\text{CAP}} - \text{P(2VPy)}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>mobile Phase v/v</b>			
<b>100 : 0</b>	3,84	0,34	
<b>99 : 1</b>	1,07	0,43	1,66
<b>95 : 5</b>	0,35	0,43	0,56

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Zugabe von 1% Wasser oder Methanol oder 0,1% TFA zum Acetonitril bewirkte eine Verringerung der Chloramphenicol-Retention auf allen Polymeren. Dies verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen zwischen Chloramphenicol und den Polymeren, unter Verwendung eines apolaren Lösemittels wie Acetonitril, überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen basierten.

#### 4.2.1.1.2. Einfluss der molekularen Prägung

In der Abbildung 4-16 wird die Retention des Chloramphenicols auf den unterschiedlich geprägten Polymeren verglichen.

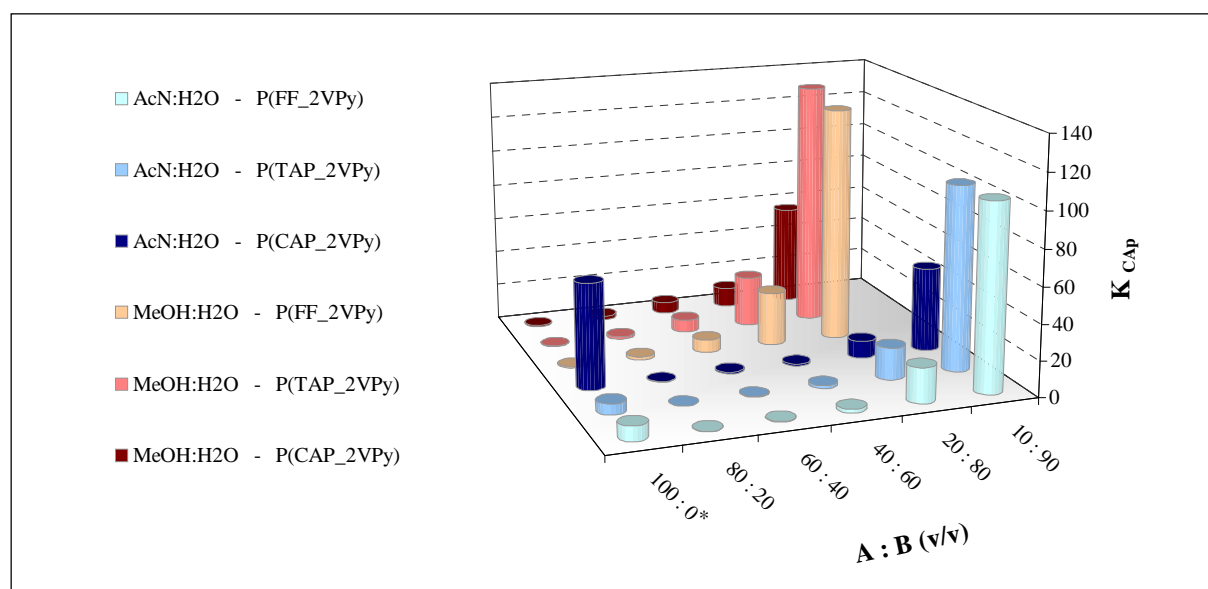


Abb. 4-16: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren; (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Florfenicol und Thiamphenicol geprägten Polymere wiesen in den Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen ein höheres Retentionsvermögen für Chloramphenicol auf als das Chloramphenicol geprägte Polymer. Dabei bestand kein Unterschied zwischen den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy). Mit Acetonitril als mobile Phase wurde dagegen die größte Retention des Chloramphenicols ( $K = 58,65$ ) auf der stationären Phase P(CAP\_2VPy) erreicht. Auf P(FF\_2VPy) bzw. P(TAP\_2VPy) waren in Acetonitril die

Retentionsfaktoren des Chloramphenicols deutlich geringer ( $K < 10$ ), wobei auf P(FF\_2VPy) ein höherer Wert als auf P(TAP\_2VPy) erzielt wurde.

#### **4.2.1.2. Prägungseffekt gegenüber Chloramphenicol**

##### 4.2.1.2.1. Einfluss der mobilen Phase

In den Abbildungen 4-17 a – c sind die Prägungsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Chloramphenicols dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den verschiedenen MIPs erzielt wurden. Unter Verwendung von Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen als mobile Phase waren die Prägungsfaktoren auf den stationären Phasen P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) kleiner 4 und auf der stationären Phase P(CAP\_2VPy) kleiner 1,5. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Prägungsfaktoren. Die höchsten Prägungsfaktoren wurden unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase erzielt. Allerdings waren auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) diese Prägungsfaktoren nur geringfügig höher als in wässrigen Lösemittelmischungen.

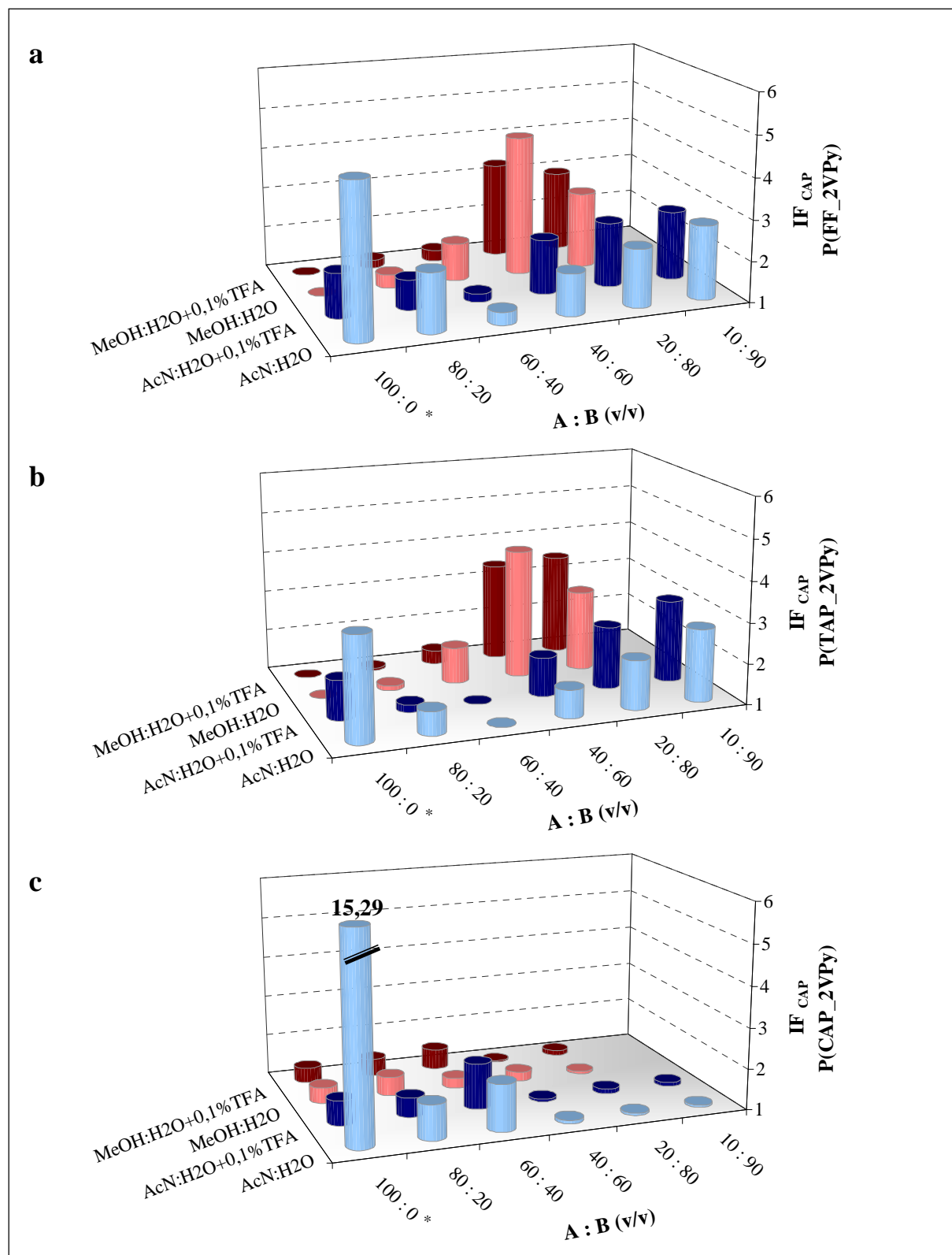


Abb. 4-17: Prägungsfaktoren (IF) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O) auf den MIPs, die mit Florfenicol (a), Thiamphenicol (b) oder Chloramphenicol (c) molekular geprägt wurden; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

In der Tabelle 4-26 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen Wasser, Methanol oder Säure im Acetonitril auf den Prägungseffekt gegenüber dem Zielanalyten Chloramphenicol auswirkten (siehe auch Abb. 4-17 a – c).

Tab. 4-26: Prägungsfaktoren (IF) des Chloramphenicols (0,1 µmol/ml) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren

Polymer	IF <sub>CAP</sub> – P(FF_2VPy)			IF <sub>CAP</sub> – P(TAP_2VPy)			IF <sub>CAP</sub> – P(CAP_2VPy)		
	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0</b>	4,67	2,08		3,53	1,97		15,29	1,60	
<b>99 : 1</b>	11,7	2,06	1,54	8,89	2,16	1,24	4,18	1,55	3,65
<b>95 : 5</b>	2,69	2,13	1,57	2,05	1,57	1,15	1,66	1,33	1,80

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die in Tabelle 4-26 dargestellten Prägungsfaktoren verdeutlichen, dass bereits die Zugabe von 1% Methanol oder 0,1% TFA zum Acetonitril eine Verringerung des Prägungseffektes bewirkte. Der Zusatz von 1% Wasser zum Acetonitril verringerte ebenfalls den Prägungseffekt auf dem Polymer P(CAP\_2VPy). Dagegen wurde auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) durch die Zugabe von 1% Wasser zum Acetonitril der Prägungsfaktor erhöht. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass unter Zugabe von Wasser zum Acetonitril die relativ geringe Chloramphenicol-Retention auf diesen Polymeren weiter abnahm. Des Weiteren war mit weiter ansteigendem Wasser-Anteil (> 50%) ein abnehmender Prägungseffekt zu beobachten. Die Verringerung des Prägungseffektes durch Zugabe von Wasser, Methanol oder Säure verdeutlicht, dass die selektiven Wechselwirkungen zwischen Chloramphenicol und den Prägungskavitäten, unter Verwendung eines apolaren Lösemittels wie Acetonitril, überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen basierten.

#### 4.2.1.2.2. Einfluss der molekularen Prägung

In der Abbildung 4-18 wird der Prägungseffekt gegenüber dem Zielanalyten Chloramphenicol auf den unterschiedlich geprägten Polymeren verglichen.

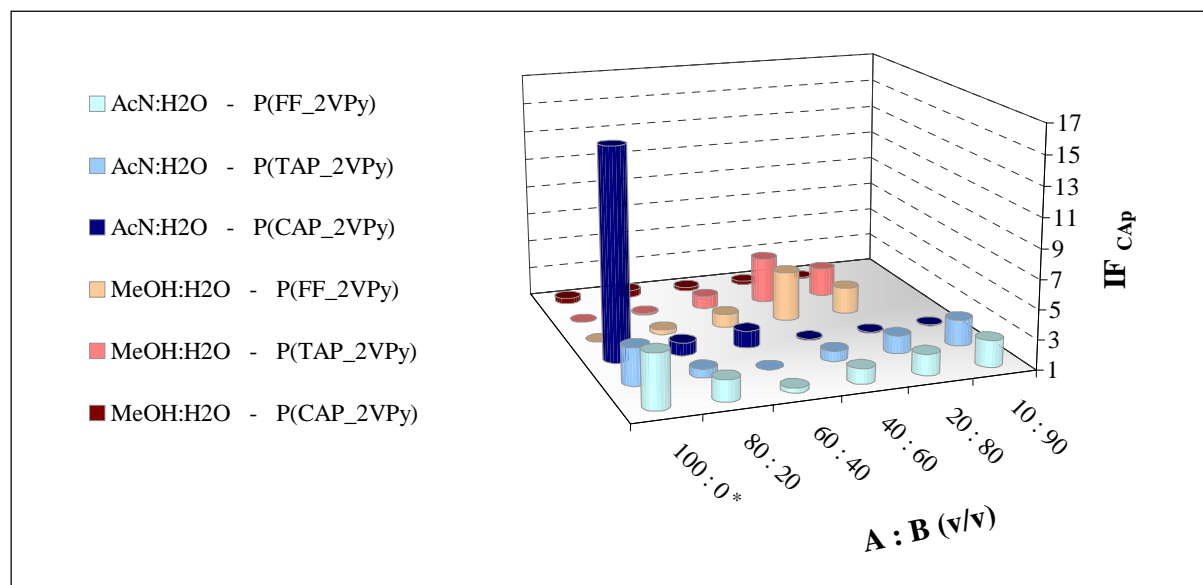


Abb. 4-18: Prägungsfaktoren (IF) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren; (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Florfenicol und Thiamphenicol geprägten Polymere wiesen in den Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen höhere Prägungsfaktoren für Chloramphenicol auf als das Chloramphenicol geprägte Polymer. Dabei bestand kein Unterschied zwischen den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy). Der höchste Prägungsfaktor des Chloramphenicols (IF = 15,29) wurde auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) mit der mobilen Phase Acetonitril ohne Wasserzusatz erzielt. Auf P(FF\_2VPy) bzw. P(TAP\_2VPy) waren in Acetonitril die Prägungsfaktoren deutlich geringer als auf P(CAP\_2VPy), wobei auf P(FF\_2VPy) der Prägungsfaktor (IF = 4,67) höher war als auf P(TAP\_2VPy) (IF = 3,53). Dies verdeutlicht, dass der Prägungseffekt, insbesondere in Acetonitril, stark von der Art der Prägungskavität und somit vom verwendeten Templat während der Polymersynthese abhängig war.

#### 4.2.1.3. Separation des Chloramphenicols

##### 4.2.1.3.1. Retention des Florfenicols und Thiamphenicols

In den Abbildungen 4-19 a – b sind die Retentionsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Florfenicols und Thiamphenicols dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den verschieden geprägten MIPs und dem NIP erzielt wurden.



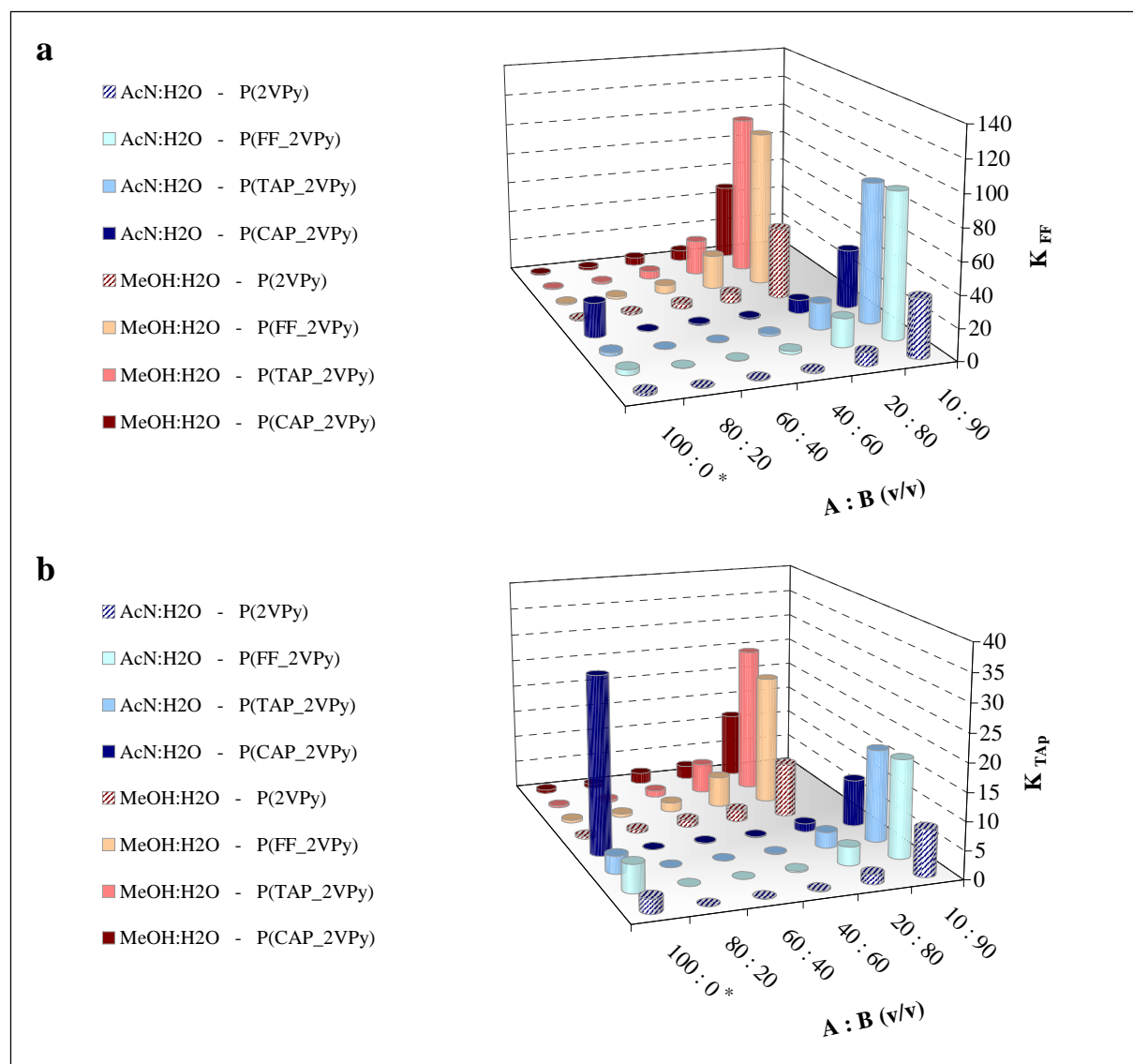


Abb. 4-19: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Florfenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Thiamphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren (Zusatz FF bzw. TAP bzw. CAP kennzeichnet MIP); (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die zum Chloramphenicol strukturähnlichen Moleküle Florfenicol und Thiamphenicol (siehe Abschnitt 2.2.1.) wurden ebenfalls von jedem der getesteten MIPs und dem NIP retiniert. Allerdings war deren Retention geringer als die des Chloramphenicols (Abschnitt 4.2.1.1.). Auf allen Polymeren konnte eine zunehmende Retention des Florfenicols und Thiamphenicols mit ansteigendem Wasser-Gehalt in den Acetonitril/Wasser- sowie Methanol/Wasser-Mischungen ab einem Wasser-Gehalt von 20% festgestellt werden. Florfenicol wurde im wässrigen Milieu stärker retiniert als Thiamphenicol. Beinhaltete die mobile Phase weniger

als 70% Wasser in den Acetonitril/Wasser-Mischungen bzw. weniger als 30% Wasser in den Methanol/Wasser-Mischungen, wurden Florfenicol und Thiamphenicol geringfügig oder nicht retiniert. Mit Acetonitril als mobile Phase konnte auf den MIPs eine erhöhte Retention des Florfenicols und Thiamphenicols festgestellt werden. Dabei wurde Thiamphenicol stärker als Florfenicol retiniert. Der Zusatz von 0,1% TFA zur mobilen Phase bewirkte eine Verschlechterung der Florfenicol- und Thiamphenicol-Retention.

Die Florfenicol und Thiamphenicol geprägten Polymere wiesen in den Acetonitril/Wasser- und den Methanol/Wasser-Mischungen, ebenso wie beim Chloramphenicol (Abschnitt 4.2.1.1.), ein höheres Retentionsvermögen für Florfenicol und Thiamphenicol auf als das Chloramphenicol geprägte Polymer. Dabei bestand kein Unterschied zwischen den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy). Mit Acetonitril als mobile Phase wurde dagegen die größte Retention des Florfenicols und Thiamphenicols, mit einem Retentionsfaktor von 21,98 bzw. 31,76 (Anhang 1 und 2), auf der stationären Phase P(CAP\_2VPy) erreicht. Weiterhin retinierte das Polymer P(FF\_2VPy) in Acetonitril Florfenicol aber auch Thiamphenicol stärker als das Polymer P(TAP\_2VPy).

In den Tabelle 4-27 und 4-28 ist dargestellt, wie sich geringe Mengen an Wasser, Methanol oder Säure im Acetonitril auf die Retention des Florfenicols und Thiamphenicols auswirkten.

Tab. 4-27: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (0,1 µmol/ml) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren

Polymer	K <sub>FF</sub> – P(FF_2VPy)			K <sub>FF</sub> – P(TAP_2VPy)			K <sub>FF</sub> – P(CAP_2VPy)		
	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0</b>	3,28	-0,01		2,12	0,16		21,98	0,21	
<b>99 : 1</b>	2,60	0,06	0,01	2,09	0,17	0,00	1,89	0,29	3,25
<b>95 : 5</b>	0,11	0,12	0,02	0,06	0,04	-0,02	0,23	0,24	0,58

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-28: Retentionsfaktoren (K) des Thiamphenicols (0,1 µmol/ml) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren

Polymer	K <sub>TAP</sub> – P(FF_2VPy)			K <sub>TAP</sub> – P(TAP_2VPy)			K <sub>TAP</sub> – P(CAP_2VPy)		
	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O v/v	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0</b>	4,97	0,01		3,18	0,19		31,76	0,38	
<b>99 : 1</b>	4,09	0,08	0,02	2,16	0,18	0,01	3,18	0,47	4,85
<b>95 : 5</b>	0,15	0,21	0,01	0,09	0,09	-0,02	0,34	0,35	0,90

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Zugabe von 1% Wasser oder Methanol oder 0,1% TFA zum Acetonitril bewirkte eine deutliche Verschlechterung der Florfenicol- und Thiamphenicol-Retention auf allen Polymeren. Dies verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen zwischen Florfenicol bzw. Thiamphenicol und dem Polymer unter Verwendung eines apolaren Lösemittels, wie beim Chloramphenicol, ebenfalls überwiegend auf Wasserstoffbrückenbindungen basierten.

#### 4.2.1.3.2. Einfluss der mobilen Phase

Die Tabellen 4-29 und 4-30 zeigen die Separationsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol auf den verschieden geprägten Polymeren unter Verwendung von Acetonitril/Wasser- und Acetonitril/Methanol-Mischungen. Die Separationsfaktoren mit Werten größer 1 zeigen, dass Chloramphenicol von den Polymeren stärker retiniert wurde als Florfenicol und Thiamphenicol. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass mit Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen hohen Wasser-Anteil hatten, die Separation des Chloramphenicols bezogen auf Thiamphenicol zunahm. Florfenicol wurde mit Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen hohen Wasser-Anteil hatten, weniger vom Chloramphenicol separiert als in Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil kleiner 50% aufwiesen. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Acetonitril/Wasser-Mischungen hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Separation.

Tab. 4-29: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Florfenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren

Polymer	$\alpha_{\text{FF}} - \text{P}(\text{FF\_2VPy})$			$\alpha_{\text{FF}} - \text{P}(\text{TAP\_2VPy})$			$\alpha_{\text{FF}} - \text{P}(\text{CAP\_2VPy})$		
mobile Phase v/v	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
100 : 0*	2,47	25,71		2,90	1,23		2,67	2,64	
99 : 1*	2,13	6,12	77,14	2,02	2,38	148,00	2,36	2,34	2,16
95 : 5*	3,29	3,11	23,50	5,00	7,63	15,12	2,51	2,38	2,33
80 : 20	2,18	3,20	3,96	3,93	8,35	6,29	1,84	1,82	2,54
60 : 40	1,28	1,41	2,74	1,39	1,71	6,14	1,18	1,31	1,54
40 : 60	1,08	1,20	1,66	1,14	1,24	1,71	1,14	1,26	2,17
20 : 80	1,09	1,21	0,85	1,06	1,19	0,95	1,12	1,24	1,25
10 : 90	1,13	1,23	0,74	1,16	1,23	0,77	1,26	1,29	0,88

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-30: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Thiamphenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren

Polymer	$\alpha_{\text{TAP}} - \text{P}(\text{FF\_2VPy})$			$\alpha_{\text{TAP}} - \text{P}(\text{TAP\_2VPy})$			$\alpha_{\text{TAP}} - \text{P}(\text{CAP\_2VPy})$		
mobile Phase v/v	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
100 : 0*	1,63	25,71		1,93	1,01		1,85	1,43	
99 : 1*	1,35	4,88	31,76	1,95	2,22	88,8	1,41	1,43	1,45
95 : 5*	2,35	1,8	82,25	3,01	3,12	15,12	1,72	1,64	1,50
80 : 20	18,05	12,60	6,53	4,40	6,64	2,59	21,86	5,73	1,78
60 : 40	103,75	22,53	74,00	7,61	17,42	1,59	8,73	6,08	2,18
40 : 60	7,86	6,68	8,30	12,54	9,53	10,00	7,79	6,94	2,40
20 : 80	5,90	5,83	1,62	6,24	6,60	2,17	6,77	5,18	2,48
10 : 90	5,91	5,82	1,44	6,21	6,38	1,47	5,55	5,31	1,76

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Abgesehen vom Polymer P(CAP\_2VPy) nahmen die Separationsfaktoren durch Zugabe von Wasser, Methanol oder TFA zum Acetonitril zu. Dies deutet darauf hin, dass Florfenicol und Thiamphenicol weniger dazu in der Lage sind, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden als

Chloramphenicol. Im Gegensatz zum wässrigen Milieu wurde unter Verwendung von Acetonitril Florfenicol stärker vom Chloramphenicol separiert als Thiamphenicol. Dies kann darauf zurück geführt werden, dass beim Florfenicol eine Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom ersetzt ist. Da die Wasserstoffbrückenbindungen als Wechselwirkungen im Acetonitril zwischen dem Molekül und der molekularen Prägungskavität überwogen, wurde Florfenicol daraus folgend weniger vom Polymer zurückgehalten, so dass es stärker vom Chloramphenicol separierte.

In der Abbildung 4-20 sind die Separationsfaktoren des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol auf den verschiedenen Polymeren unter Verwendung von Methanol/Wasser-Mischungen als mobile Phase dargestellt.

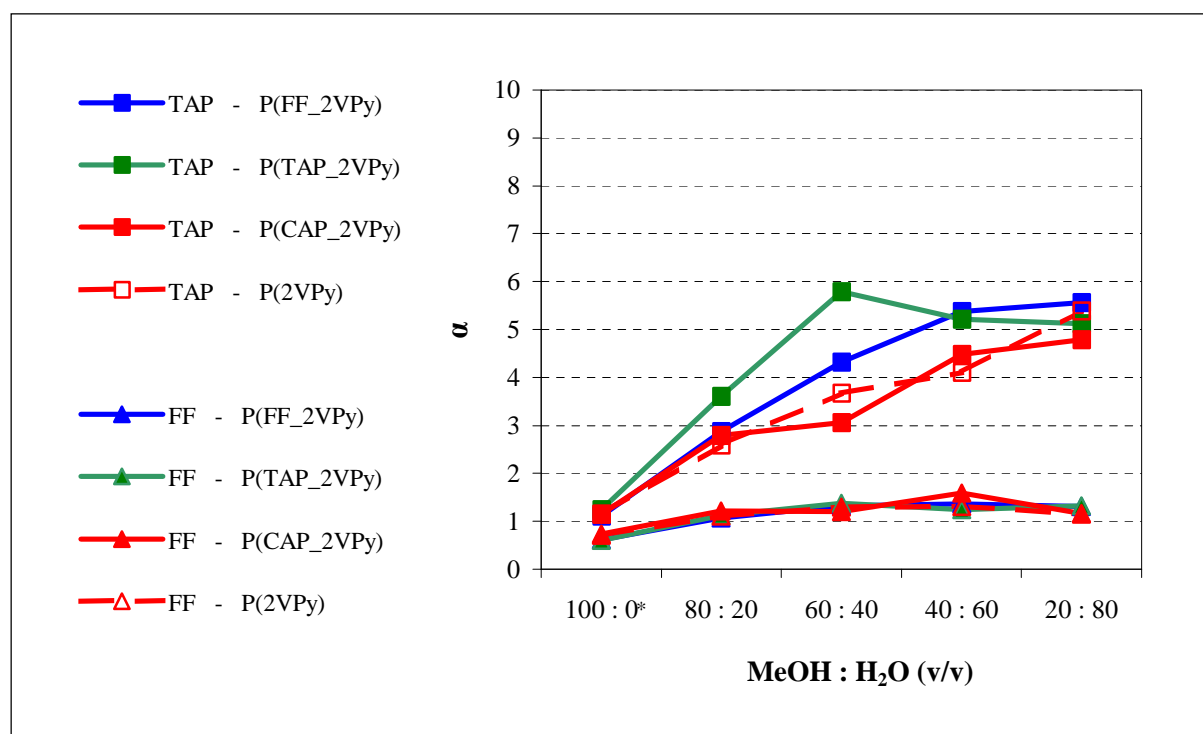


Abb. 4-20: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Florfenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Thiamphenicol (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den unterschiedlich geprägten Polymeren (Zusatz FF bzw. TAP bzw. CAP kennzeichnet MIP); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Separationsfaktoren mit Werten größer 1 zeigen, dass Chloramphenicol von den Polymeren stärker reteniert wurde als Florfenicol und Thiamphenicol, wenn

Methanol/Wasser-Mischungen als mobile Phase dienten. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass mit höherem Wasser-Anteil in den Methanol/Wasser-Mischungen die Separation zunahm. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Methanol/Wasser-Mischungen hatte keinen Einfluss auf die Separation.

In den Abbildungen 4-21 a – b ist die Separation des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol an ausgewählten Beispielen dargestellt.

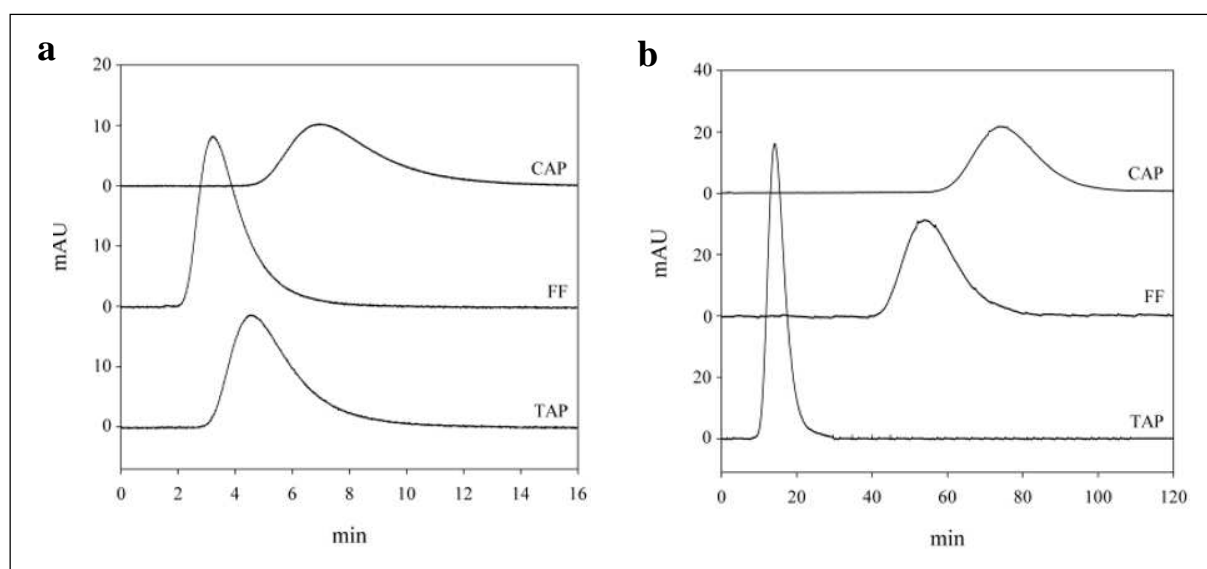


Abb. 4-21: Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(FF\_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril (a) oder Methanol/Wasser (30:70; v/v) (b) als mobile Phase; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Es konnte keine Basislinientrennung zwischen Chloramphenicol und Florfenicol erreicht werden, da bei chromatographischen Trennungen auf MIPs die Problematik bestand, dass retinierte Substanzen in einem breiten Peak eluierten. Zwischen Chloramphenicol und Thiamphenicol konnte eine Basislinientrennung in wasserreichen mobilen Phasen erzielt werden, da Thiamphenicol im wässrigen Milieu deutlich weniger zu hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Polymer in der Lage war als Chloramphenicol.

##### 4.2.1.3.3. Einfluss der molekularen Prägung

Die MIPs erzielten überwiegend höhere Separationsfaktoren für Chloramphenicol bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol unter Verwendung von Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen als das NIP (Tab. 4-29; 4-30 und Abb. 4-20). Weiterhin wurde Chloramphenicol auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) in Methanol/Wasser-Mischungen stärker vom Thiamphenicol separiert als auf dem Polymer P(CAP\_2VPy). Dies verdeutlicht, dass die Prägungskavitäten, insbesondere bei den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy), auch in wässrigen Lösemittelmischungen hinsichtlich der Wiedererkennung des Zielanalytens von Bedeutung waren.

##### 4.2.1.4. Zusammenfassende Betrachtung

Die größten Prägungseffekte gegenüber Chloramphenicol wurden auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) ebenso wie auf dem Polymer P(CAP\_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril erzielt. Die Zugabe von Wasser, Methanol oder TFA zum Acetonitril bewirkte eine Verringerung des Prägungseffektes und somit eine Verringerung der Chloramphenicol-Retention. Folglich basierten die Wechselwirkungen auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen. Allerdings war der Prägungseffekt und daher auch die Retention des Chloramphenicols auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) in Acetonitril deutlich geringer als auf dem mit Chloramphenicol geprägten Polymer P(CAP\_2VPy). Offensichtlich ist die geprägte Nitrogruppe beim P(CAP\_2VPy) im apolaren Lösemittel maßgeblich an den selektiven Wechselwirkungen beteiligt. Beim Florfenicol und Thiamphenicol ist die Nitrogruppe durch eine Methylsulfonylgruppe ersetzt (siehe Abschnitt 2.2.1.), wobei diese Gruppe offensichtlich keine Wasserstoffbrückenbindungen mit dem funktionellen Monomer während des Prägungsprozesses einging. Die Substitution einer Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom, wie es beim Florfenicol der Fall ist, hatte keinen Einfluss auf den Prägungseffekt, da das Thiamphenicol geprägte Polymer sogar geringfügig niedrigere Retentions- und Prägungsfaktoren für Chloramphenicol unter Verwendung von Acetonitril erzielte als das Florfenicol geprägte Polymer. Anscheinend war der Prägungsabdruck dieser Hydroxylgruppe nicht an den Wechselwirkungen zum Zielanalyten beteiligt. Obwohl die Polymere mit Florfenicol oder Thiamphenicol geprägt waren, wurden Florfenicol und Thiamphenicol im Vergleich zum Chloramphenicol unter Verwendung von

Acetonitril geringer retiniert. Dies verdeutlicht, dass die mögliche Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Prägungskavität von größerer Bedeutung war als die Übereinstimmung in Form und Größe des Zielmoleküls mit der Prägungskavität. Weiterhin wurde Florfenicol in Acetonitril geringer retiniert als Thiamphenicol. Dies ist darauf zurückzuführen, dass beim Florfenicol eine Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom ersetzt ist.

Die starke Retention des Chloramphenicols unter wässrigen Bedingungen war überwiegend auf nicht selektive hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen. Dabei waren die Prägungsfaktoren, mit Werten bis 4, und daraus folgend die Retentionsfaktoren des Chloramphenicols, auf den Florfenicol und Thiamphenicol geprägten Polymeren in wässrigen Lösemittelmischungen größer als auf dem Chloramphenicol geprägten Polymer ( $IF < 1,5$ ). Die Retention des Florfenicols und Thiamphenicols war mit der Retention des Chloramphenicols vergleichbar, wobei diese geringer von den Polymeren im wässrigen Milieu retiniert wurden als Chloramphenicol. Somit wurden auch Florfenicol und Thiamphenicol in wasserreichen Lösemittelmischungen stärker vom P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) retiniert als vom P(CAP\_2VPy). Weiterhin wiesen die MIPs eine höhere Separation des Chloramphenicols bezogen auf Florfenicol und Thiamphenicol auf als das NIP P(2VPy). Folglich hatten die mit Florfenicol oder Thiamphenicol geprägten Bindungskavitäten im wässrigen Milieu einen größeren Einfluss auf die Analytenretention als die mit Chloramphenicol geprägten Bindungskavitäten.

Basierend auf den Ergebnissen des Abschnittes 4.1.3. sollte die Anwendung der Polymere P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) als Sorbent in einer online-Festphasenextraktion, die mit einer LC-MS/MS gekoppelt ist, unter Verwendung von wässrigen Lösemittelmischungen zur Chloramphenicol-Bestimmung möglich sein. Da es sich beim Templat und Zielanalyten nicht um die gleiche Verbindung handelt, können die im Abschnitt 4.1.3. dargestellten Templatausblutungen und die daraus folgende Störung der Chloramphenicol-Quantifizierung mit diesen Polymeren nicht auftreten. Allerdings war für die Aufreinigung und Aufkonzentrierung zur Chloramphenicol-Bestimmung aus verschiedenen Bienenprodukten ein apolares Lösemittel, wie Acetonitril oder Ethylacetat, von Interesse. Die chromatographische Evaluierung der Polymere, die mit den zum Chloramphenicol strukturähnlichen Molekülen Florfenicol oder Thiamphenicol geprägt waren, zeigte jedoch, dass unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase keine ausreichende Retention, auf



Grund verminderter Prägungsfaktoren, erzielt werden konnte. Deshalb wären für zukünftige Versuche strukturähnliche Moleküle von Interesse, die in der Lage sind, im gleichen Umfang wie Chloramphenicol Wechselwirkungen mit dem funktionellen Monomer einzugehen. In dieser Arbeit wurden zur Separation von Chloramphenicol erstmals Polymere verwendet, die mit zum Chloramphenicol strukturähnlichen Molekülen geprägt waren.

### **4.2.2. Manuelle Festphasenextraktion**

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen HPLC-Untersuchungen wurden verschiedene Waschlösungen bei der Festphasenextraktion von Chloramphenicol mit den Sorbentien P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) getestet. Um die hydrophoben Wechselwirkungen nutzen zu können, wurden Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen verwendet. Acetonitril und Ethylacetat dienten als Waschlösung, um die selektiven Wasserstoffbrückenbindungen zur Extraktion des Chloramphenicols zu nutzen.

#### **4.2.2.1. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen**

In der Tabelle 4-31 sind die Wiederfindungen des Chloramphenicols nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung dargestellt, wobei als Waschlösungen Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen verwendet wurden. Diente als Sorbent zur Festphasenextraktion das Polymer P(FF\_2VPy), wurden Wiederfindungen von größer 95% erzielt, wenn der Acetonitril-Anteil in der Waschlösung kleiner 25% war. Betrug der Methanol-Gehalt weniger als 30% in der Waschlösung, wurde eine Chloramphenicol-Wiederfindung von annähernd 100% im Eluat erreicht. Dagegen wies das Polymer P(TAP\_2VPy) ein deutlich geringeres Retentionsvermögen für Chloramphenicol während des Waschens mit Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen auf als das Polymer P(FF\_2VPy), was zu geringeren Wiederfindungen führte. Weiterhin wurde deutlich, dass die Elutionskraft der Waschlösung mit zunehmendem Acetonitril- oder Methanol-Gehalt größer wurde, da Acetonitril und Methanol die hydrophoben Wechselwirkungen störten. Dabei zeigte das apolarere Acetonitril im Vergleich zum Methanol einen stärkeren störenden Effekt auf die hydrophoben Wechselwirkungen. Dies entspricht den Ergebnissen der chromatischen

Evaluierung, wobei Acetonitril ebenfalls eine stärkere Verringerung der hydrophoben Wechselwirkungen in wässrigen Lösemittelmischungen aufwies als Methanol (Abschnitt 4.2.1.1.1.).

Tab. 4-31: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (100 nmol/100 µl) auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy), wobei verschiedene Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen als Waschlösungen dienten

	CAP-Wiederfindung (%)							
Polymer	P(FF_2VPy)				P(TAP_2VPy)			
Waschlösung (v/v)	AcN : H <sub>2</sub> O		MeOH : H <sub>2</sub> O		AcN : H <sub>2</sub> O		MeOH : H <sub>2</sub> O	
	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution	Waschen	Elution
<b>40 : 60</b>			87,0	<b>15,5</b>			86,9	<b>14,7</b>
<b>35 : 65</b>			40,1	<b>57,5</b>			69,9	<b>30,5</b>
<b>30 : 70</b>	96,5	<b>2,9</b>	12,4	<b>85,3</b>	99,4	<b>1,2</b>	32,7	<b>67,3</b>
<b>25 : 85</b>	98,1	<b>1,6</b>	0,6	<b>101,6</b>	97,2	<b>0,9</b>	24,6	<b>75,0</b>
<b>20 : 80</b>	94,3	<b>6,7</b>	0,2	<b>98,0</b>	98,3	<b>2,8</b>	6,1	<b>91,2</b>
<b>15 : 85</b>	5,5	<b>95,4</b>	0,0	<b>98,4</b>	47,5	<b>52,2</b>	4,9	<b>93,7</b>
<b>10 : 90</b>	3,0	<b>95,2</b>	0,0	<b>101,7</b>	27,8	<b>69,8</b>	1,3	<b>96,9</b>
<b>5 : 95</b>	0,1	<b>97,3</b>			0,7	<b>97,8</b>		
<b>0 : 100</b>	0,0	<b>100,6</b>	0,0	<b>100,6</b>	1,1	<b>96,6</b>	1,1	<b>96,6</b>

SPE-Bedingungen: 100 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl MeOH:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser; Waschen mit 10 ml Waschlösung; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

#### 4.2.2.2. Waschen mit apolaren Lösemitteln

Die Tabelle 4-32 zeigt die Chloramphenicol-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion, wobei mit Acetonitril oder Ethylacetat gewaschen wurde.

Tab.4-32: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (2,5 nmol/100 µl) auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy), wobei Acetonitril oder Ethylacetat als Waschlösung diente

Polymer	Waschlösung	CAP-Wiederfindung (%)					Summe
		1. Waschen (1 ml)	2. Waschen (1 ml)	3. Waschen (1 ml)	4. Waschen (2 ml)	Elution	
<b>P(FF_2VPy)</b>	<b>Acetonitril</b>	51,3	42,1	5,4	1,6	<b>1,0</b>	101,3
	<b>Ethylacetat</b>	0,0	0,0	0,0	19,5	<b>80,9</b>	100,4
<b>P(TAP_2VPy)</b>	<b>Acetonitril</b>	68,1	25,9	4,2	1,5	<b>0,0</b>	99,7
	<b>Ethylacetat</b>	0,0	3,1	11,0	30,2	<b>54,0</b>	98,2

SPE-Bedingungen: 2,5 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl Acetonitril oder Ethylacetat; Kartuschen gepackt mit 100 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril oder Ethylacetat; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Mit Acetonitril als Waschlösung eluierten mehr als 50% des aufgetragenen Chloramphenicols mit dem ersten Milliliter Waschlösung von der Kartusche, wenn diese mit P(FF\_2VPy) oder P(TAP\_2VPy) gepackt war. Daher konnte kein Chloramphenicol in der Elutionslösung detektiert werden, nachdem mit 5 ml Acetonitril gewaschen wurde. Dienten während der Festphasenextraktion mit dem Sorbent P(FF\_2VPy) 5 ml Ethylacetat als Waschlösung, wurde eine Wiederfindung von über 80% erreicht. Dabei ist zu beachten, dass während der ersten drei Milliliter Waschlösung kein Chloramphenicol von der Kartusche eluierte. Das Polymer P(TAP\_2VPy) erzielte nach Waschen mit 5 ml Ethylacetat eine Wiederfindung von 54%, wobei während der ersten drei Milliliter Waschlösung nur 3,1% des Chloramphenicols von der Kartusche eluierten. Somit wies das Polymer P(TAP\_2VPy) unter Verwendung eines apolaren Lösemittels ebenfalls ein geringeres Retentionsvermögen des Chloramphenicols während des Waschschrilles auf als das Polymer P(FF\_2VPy).

Da Ethylacetat apolarer als Acetonitril ist, begünstigte es die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, so dass höhere Wiederfindungen unter Verwendung von Ethylacetat im Vergleich zum Acetonitril als Waschlösung erhalten wurden (Beurteilung der Ergebnisse siehe auch Abschnitt 4.1.2.3. und 4.1.2.4.). Das Retentionsvermögen der Polymere war während der Festphasenextraktion mit Acetonitril oder Ethylacetat geringer als mit Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen. Dies kann mit den Retentionsfaktoren, die mittels der HPLC-Analysen (Abschnitt 4.2.1.1.) bestimmt wurden,

verdeutlicht werden. Der Retentionsfaktor des Chloramphenicols auf dem Polymer P(FF\_2VPy) und der mobilen Phase Acetonitril betrug 8,11. Dagegen wurde mit den Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil größer 85% und Methanol/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil größer 70% hatten, Retentionsfaktoren größer 100 ermittelt (siehe Anhang A2).

In der Tabelle 4-33 ist die Wiederholbarkeit der Chloramphenicol-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion, wobei unter modifizierten Bedingungen mit Acetonitril oder Ethylacetat gewaschen wurde, dargestellt.

Tab.4-33: Wiederholbarkeit der Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Chloramphenicol-Lösung (2,5 nmol/100 µl) auf den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) unter Verwendung von Acetonitril oder Ethylacetat als Waschlösung

	CAP-Wiederfindung (%)			
Polymer	P(FF_2VPy)		P(TAP_2VPy)	
Waschlösung	Acetonitril	Ethylacetat	Acetonitril	Ethylacetat
<b>1. Probe</b>	4,4	101,9	3,28	89,3
<b>2. Probe</b>	8,0	99,6	6,87	84,2
<b>3. Probe</b>	6,6	100,4	5,66	88,1
<b>MW</b>	6,35	100,63	5,27	87,20
<b>STDABW</b>	1,80	1,17	1,83	2,67

SPE-Bedingungen: 2,5 nmol Chloramphenicol gelöst in 100 µl Acetonitril oder Ethylacetat; Kartusche gepackt mit 100 mg Polymer; Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril oder 2 ml Ethylacetat; Waschen mit 1 ml Acetonitril oder 3 ml Ethylacetat; Elution mit 3 ml Methanol; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Chloramphenicols siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Wurde mit 1 ml Acetonitril gewaschen waren die Wiederfindungen kleiner 10%. Dagegen konnten, nachdem mit 3 ml Ethylacetat gewaschen wurde, Wiederfindungen von annähernd 100% erzielt werden, wenn die Kartusche mit P(FF\_2VPy) gepackt war und von mehr als 85%, wenn P(TAP\_2VPy) als Sorbent diente. Somit sind die mit den zum Chloramphenicol strukturähnlichen Molekülen geprägten Polymere für die manuelle Festphasenextraktion von Chloramphenicol mit der Waschlösung Ethylacetat geeignet.

##### 4.2.2.3. Zusammenfassende Betrachtung

Die Festphasenextraktion von Chloramphenicol-Lösungen ergab, dass die Elutionskraft wässriger Lösemittelmischungen mit zunehmendem Acetonitril- oder Methanol-Gehalt größer wurde. Dies verdeutlicht, dass apolare Lösemittel in Wasser die nicht selektiven hydrophoben Wechselwirkungen des Chloramphenicols mit der Polymermatrix verringerten. Diente als Waschlösung Ethylacetat, konnte mit dem Polymer P(FF\_2VPy) eine Wiederfindung von annähernd 100% und mit dem Polymer P(TAP\_2VPy) von über 84% beobachtet werden, wobei die Retention während des Waschschrtes auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen basierte. Das Polymer P(FF\_2VPy) wies unter Verwendung aller getesteten Waschlösungen ein höheres Retentionsvermögen gegenüber Chloramphenicol während des Waschschrtes auf als das Polymer P(TAP\_2VPy), so dass höhere Wiederfindungen mit P(FF\_2VPy) erreicht wurden. Beim Vergleich der Festphasenextraktion auf dem Sorbent P(CAP\_2VPy) (Abschnitt 4.1.2.) mit den in diesem Abschnitt erzielten Ergebnissen wird deutlich, dass ein höherer Anteil an Acetonitril oder Methanol in der wässrigen Waschlösung enthalten sein kann, wenn P(FF\_2VPy) als Sorbent dient. Bis zu einem Acetonitril-Gehalt von 15% oder einem Methanol-Gehalt von 25% wurden mit dem Sorbent P(FF\_2VPy) Wiederfindungen von annähernd 100% erreicht. Mit dem Polymer P(CAP\_2VPy) konnten aber nur bis zu 5% Acetonitril oder 20% Methanol zugesetzt werden, um Wiederfindungen von annähernd 100% zu erzielen. Der höhere Anteil an Acetonitril oder Methanol ist zur Abtrennung von apolarer Matrix, wie es bei Honig- oder Propolisproben der Fall ist, von Vorteil. Unter Verwendung von Ethylacetat als Waschlösung wies das Polymer P(CAP\_2VPy) im Vergleich zu den Polymeren P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) das höchste Retentionsvermögen während des Waschschrtes auf. Dennoch sind die Polymere P(FF\_2VPy) und P(TAP\_2VPy) als Sorbent bei einer manuellen Festphasenextraktion von Chloramphenicol geeignet, wenn Ethylacetat als Waschlösung dient.

Die Feststellungen bezüglich der Elutionskraft der verschiedenen Waschlösungen entsprechen den Ergebnissen, die im vorherigen Abschnitt 4.2.1. dargestellt wurden. Bei der chromatographischen Evaluierung zeigte das P(FF\_2VPy) ein größeres Retentionsvermögen unter wässrigen Bedingungen als das P(CAP\_2VPy), wobei die Retention auf hydrophoben Wechselwirkungen basierte. Unter Verwendung von Acetonitril, bei dem die Retention auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen basierte, wies dagegen das P(CAP\_2VPy) das höchste Retentionsvermögen gegenüber dem Zielanalyten Chloramphenicol auf.

### 4.3. Nisin C-terminal analog geprägte Polymere zur Separation von Nisin

Nisin kann auf Grund seiner Größe nicht durch die hochvernetzte Matrix eines beispielsweise Bulk-Polymers diffundieren und daher nicht die Bindungsstellen erreichen (Ye & Mosbach, 2001). Deshalb wurde zur Synthese der Polymere, die eine Affinität gegenüber Nisin hatten, die Methode der hierarchischen Prägung und somit die Epitop-Strategie angewendet (Abschnitt 2.1.6.2.2. und 3.2.3.). Dabei wurde eine C-terminal analoge Nisin-Sequenz mittels der Fmoc-Strategie an die Oberfläche des Silicagelträgers immobilisiert, so dass nach Polymerisation in den Silicagelporen Polymerpartikel resultierten, bei denen die molekular geprägten Bindungsstellen auf der Oberfläche lokalisiert waren (Yilmaz et al., 2000; Titirici et al., 2002; Titirici et al., 2003; Titirici & Sellergren, 2004). Es wurde die C-terminale Sequenz für die Epitop-Strategie gewählt, da am N-terminalen Ende des Nisins die Aminosäurereste an den Positionen drei bis sieben einen intramolekularen Lanthionin-Ring bilden, so dass die N-terminale Nisin-Sequenz nur bis zum zweiten Aminosäurerest linear vorliegt.

#### 4.3.1. Elementaranalyse

Zur Kontrolle der einzelnen Syntheseschritte der hierarchischen Prägung wurde der Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalt durch Elementaranalyse für alle Vorstufen des Polymers P(Lys) bestimmt. Dies ist in der Tabelle 4-34 dargestellt.

Tab. 4-34: Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt der Vorstufen des hierarchisch geprägten Polymers P(Lys)

	% C	% N
Silicagel A <sup>‡</sup>	6,71	2,46
H-Lys-Si	7,59	2,77
G(H-Lys-Si)	25,89	1,86
P(Lys)	56,12	1,29

G = Silicagel/Polymer-Gemisch, P = Polymer; <sup>‡</sup> siehe Abschnitt 3.2.3.6. Tab. 3-2

Das Lysin modifizierte Silicagel H-Lys-Si wies einen höheren Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt auf als das ursprüngliche Silicagel A (Abschnitt 3.2.3.6. Tab. 3-2). Dies zeigt, dass das aus Kohlenstoff, Wasserstoff und Stickstoff bestehende Templat erfolgreich an die Silicageloberfläche immobilisiert wurde. Die theoretische elementare Zusammensetzung eines Polymers, das mit MAA als funktionelles Monomer und EDMA als Quervernetzer, die ein molares Verhältnis von 17:83 hatten, synthetisiert wurde, beträgt 60,2% Kohlenstoff, 32,7% Sauerstoff, 7,1% Wasserstoff und 0% Stickstoff. Folglich ist beim Silicagel/Polymer-Gemisch G(H-Lys-Si) im Vergleich zum modifizierten Silicagel durch die Zugabe und Polymerisation des Präpolymers in den Poren des Silicagels der Kohlenstoff-Gehalt größer und der Stickstoff-Gehalt kleiner. Nach Herauslösen des Silicagels aus dem Silicagel/Polymer-Gemisch muss der Kohlenstoff-Gehalt des MIPs P(Lys) annähernd 60% und der Stickstoff-Gehalt nahezu 0% betragen und somit der theoretischen elementaren Zusammensetzung des oben beschriebenen Polymers entsprechen. Der Stickstoff-Gehalt des Polymers war geringer als vom Silicagel A. Dies kann darauf zurück geführt werden, dass beim Herauslösen des Silicagels gleichzeitig die Silicagel gebundene Aminosäure Lysin größtenteils aus dem Polymer entfernt wurde. Die Untersuchungen von Titirici und Sellergren (2004) zeigten ebenfalls, dass durch die Ammoniumhydrogendifluorid-Behandlung mehr als 95% des Templats entfernt werden.

Um das Ausmaß der Templat- und Silicagelentfernung aus den Silicagel/Polymer-Gemischen beurteilen zu können, wurde von allen hergestellten hierarchisch geprägten Polymeren der Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt durch Elementaranalyse bestimmt (Tab. 4-35).

Tab. 4-35: Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt der Nisin C-terminal analog geprägten Polymere

Polymer	% C	% N
P( – )	58,25	0,45
P(Lys)	56,12	1,29
P(Lys-Ala)	53,41	1,35
P(Lys-Ala-Val)	54,62	1,23
P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val)	58,39	2,03

Die durch die Elementaranalyse ermittelten Kohlenstoff-Gehalte der Polymere zeigen, dass das Silicagel erfolgreich aus den Silicagel/Polymer-Gemischen gelöst wurde, so dass die Retention der Zielanalyten bei den nachstehenden Untersuchungen nicht durch Silicagelreste gestört werden konnte.

### 4.3.2. Chromatographische Evaluierung

#### 4.3.2.1. Retention des Nisins

##### 4.3.2.1.1. Einfluss der mobilen Phase

Auf dem Polymer P(Lys) wurden, wie in der Abbildung 4-22 dargestellt, verschiedene mobile Phasen getestet, um deren Einfluss auf die Retention (Abschnitt 3.2.4.1.) des Nisins zu untersuchen.

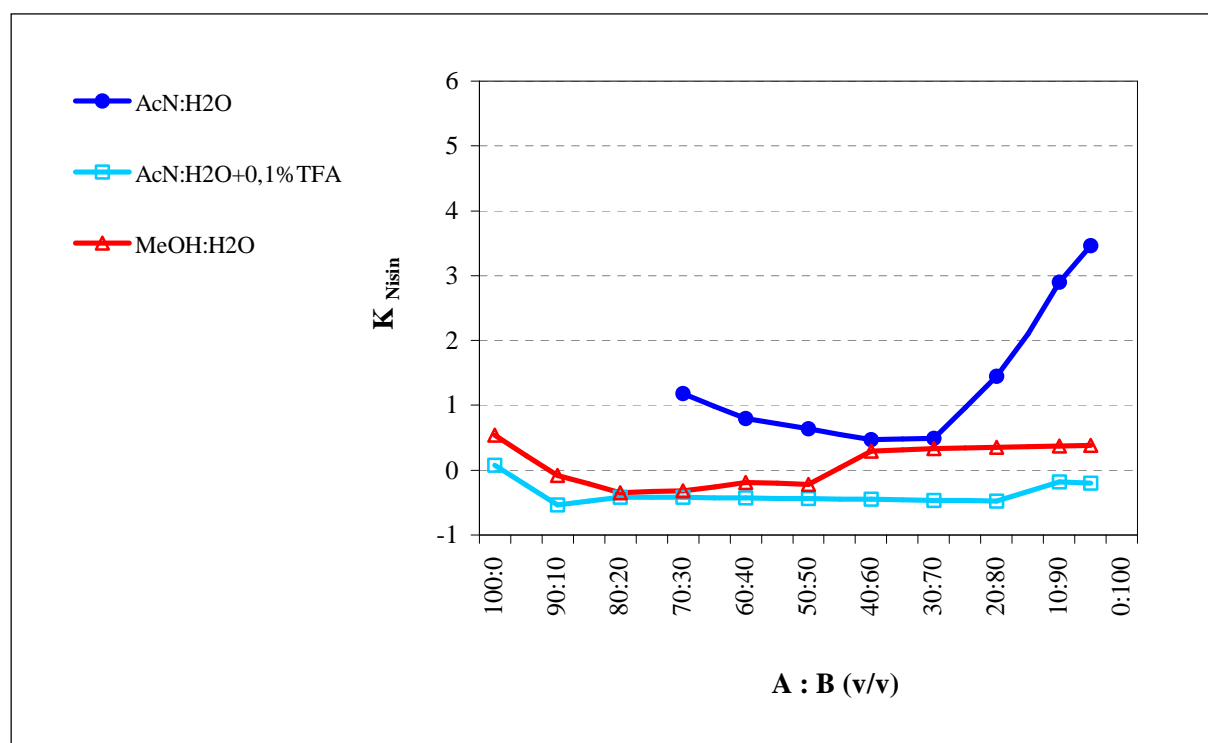


Abb. 4-22: Retentionsfaktoren (K) des Nisins (0,1 µmol/ml) auf dem Polymer P(Lys) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.



Diente eine Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase, konnte bei einem Wasser-Anteil größer 70% für Nisin eine zunehmende Affinität des Polymers P(Lys) beobachtet werden, so dass der Retentionsfaktor bei dem Acetonitril/Wasser-Verhältnis von 5:95 (v/v) einen Wert von 3,46 erreichte. Betrug der Wasser-Anteil weniger als 70%, konnte ebenfalls eine Zunahme der Retention festgestellt werden. Diese war aber mit einem maximalen Retentionsfaktor von 1,18 bei dem Acetonitril/Wasser-Verhältnis von 70:30 (v/v) vergleichsweise gering. Enthielt die Acetonitril/Wasser-Mischung weniger als 30% Wasser, eluierte Nisin, auf Grund dessen geringer Löslichkeit in apolaren Lösemitteln, nicht von der Säule. In Methanol/Wasser-Mischungen oder Acetonitril/Wasser-Mischungen, die 0,1% TFA enthielten, retenierte das MIP Nisin nicht. Enthielten die Acetonitril/Wasser-Mischungen 0,1% TFA, eluierte Nisin, auch wenn der Wasser-Anteil kleiner 30% war, da die Erniedrigung des pH-Wertes eine Erhöhung der Nisin-Löslichkeit bewirkte (Rollema et al., 1995).

Die Nisin-Retention unter wässrigen Elutionsbedingungen kann auf ionische sowie hydrophobe Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Das ermittelte Retentionsverhalten des Nisins entsprach den Ergebnissen von Rachkov und Minoura (2000; 2001), die ein auf MAA basierendes Bulk-Polymer zur Wiedererkennung des Peptidhormons Oxytocin (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly mit Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten) synthetisierten. Entsprechend der Epitop-Strategie diente als Templat das N-terminale Ende des Zielmoleküls, so dass die Sequenz Tyr-Pro-Leu-Gly (YPLG) geprägt wurde. Die Aminosäure Tyrosin wurde auf Grund ihrer guten Detektierbarkeit an das Templat angehängt. Rachkov und Minoura (2000; 2001) zeigten, dass eine Zunahme des Wasser-Gehaltes über 20% in der Acetonitril/Wasser-Mischung, das als mobile Phase diente, in einer drastischen Reduktion der Peptid-Retention resultierte. Die weitere Zunahme des Wasser-Gehaltes von 70% auf 90% führte dagegen zu einem Anstieg der Oxytocin-Retention. Stieg der Wasser-Gehalt in der mobilen Phase von 0% auf 30% an, wurden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der gelösten Substanz und den Wiedererkennungsstellen des MIPs gestört, was die starke Abnahme der Retention und Selektivität verursachte. Eine weitere Zunahme des Wasser-Gehaltes in der mobilen Phase führte dagegen zu einer wieder stärkeren Bindung des Analyten an das MIP, wobei dies durch ionische sowie hydrophobe Wechselwirkungen erklärt werden konnte. Rachkov et al. (2004) bestätigte die essentielle Rolle der ionischen Wechselwirkungen zwischen dem Zielanalyten und dem MIP unter wässrigen Elutionsbedingungen, da die Retention des Peptids [Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup>]Angiotensin II auf dem

entsprechend geprägten Polymer in einer wässrigen mobilen Phase eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert aufwies.

Auf Grund der hier dargestellten Ergebnisse dienten als mobile Phasen für die nachstehenden Untersuchungen zur Nisin-Bestimmung Acetonitril/Wasser-Mischungen, die ein Verhältnis zwischen 20:80 (v/v) und 5:95 (v/v) aufwiesen.

##### 4.3.2.1.2. Einfluss der molekularen Prägung

In der Abbildung 4-23 sind die Retentionsfaktoren des Nisins auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren dargestellt.

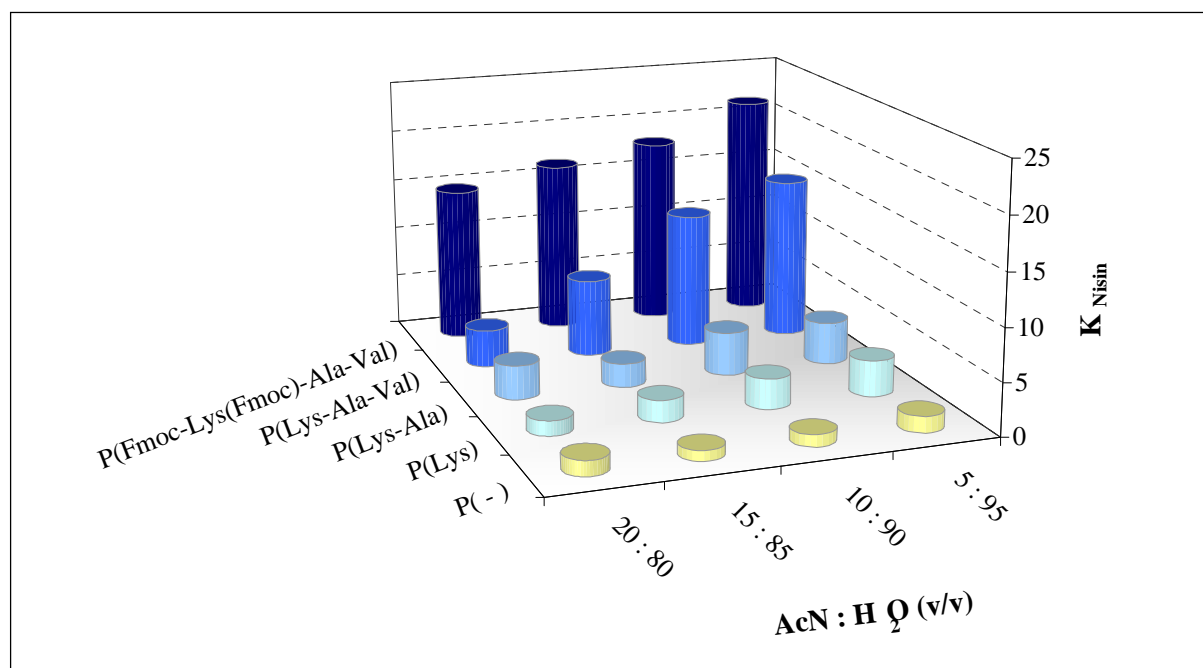


Abb. 4-23: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Nisins (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Entsprechend der Darstellung im Abschnitt 4.3.2.1.1. konnte auf allen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren mit steigendem Wasser-Anteil in der Acetonitril/Wasser-Mischung eine zunehmende Nisin-Retention beobachtet werden. Die größten Retentionsfaktoren wurden mit der Acetonitril/Wasser-Mischung, die ein Volumenverhältnis

von 5:95 aufwies, erzielt. Des Weiteren war deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Länge bzw. Größe (Fmoc-Schutzgruppen) der geprägten C-terminalen Nisin-Sequenz auch die Retentionsfaktoren zunahmen. Die größte Affinität zum Nisin zeigten daher die Polymere P(Lys-Ala-Val) und P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val). Das NIP retenierte Nisin nicht. Demnach basierte die Retention des Nisins auf selektiven ionischen sowie hydrophoben Wechselwirkungen.

### 4.3.2.2. Prägungseffekt gegenüber Nisin

In der Abbildung 4-24 sind die Prägungsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Nisins auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren dargestellt.

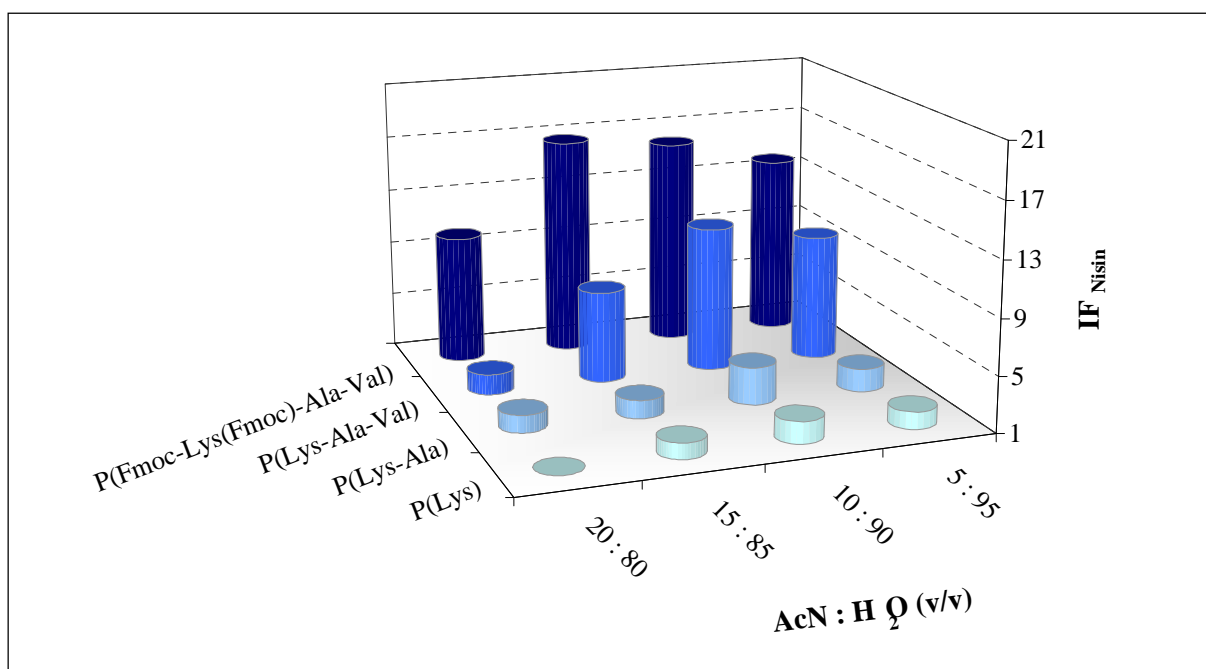


Abb. 4-24: Prägungsfaktoren (IF) des Nisins (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Auf allen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren wurden die größten Prägungsfaktoren unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil über 80% aufwiesen, beobachtet. Bei einem Acetonitril/Wasser-Volumenverhältnis von 15:85 bis 5:95 nahm der Prägungsfaktor nicht weiter zu, wobei gleichzeitig die Retention mit zunehmenden

Wasser-Anteil anstieg. Den gleichen Effekt beobachtete Rachkov et al. (2004) bei dem mit [Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup>]Angiotensin II geprägten Polymer, da bei einer Wasser-Zunahme von 75% auf 85% in der Acetonitril/Wasser-Mischung, die als mobile Phase diente, die Retention des Peptids zunahm aber gleichzeitig der Prägungsfaktor unverändert blieb. Dies wurde durch die Zunahme der nicht selektiven Wechselwirkungen erklärt. Weiterhin war deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Länge bzw. Größe der geprägten C-terminal analogen Nisin-Sequenz auch der Prägungseffekt zunahm, so dass die größten Prägungsfaktoren des Nisins auf den Polymeren P(Lys-Ala-Val) und P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val) erzielt wurden.

#### 4.3.2.3. Separation des Nisins

Um die Separation des Nisins beurteilen zu können, wurden Lysin als C-Terminus des Nisins und Lys-Ala als C-terminal analoge Dipeptidsequenz des Nisins gewählt. Unter den Bedingungen, bei denen eine maximale Nisin-Retention erzielt wurde, konnte keine Retention des Lysins und Lys-Ala beobachtet werden, so dass die Retentionsfaktoren Werte kleiner 0,1 aufwiesen (siehe Abschnitt 4.3.2.4.1.). Die Tabelle 4-36 zeigt die Separationsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Nisins bezogen auf Lysin und Lys-Ala auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren.

Tab. 4-36: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Nisins (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Lysin (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Lys-Ala (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren

Polymer	P(–)		P(Lys)		P(Lys-Ala)		P(Lys-Ala-Val)		P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val)	
	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$
<b>20 : 80</b>	8,98	10,70	7,83	6,70	51,62	361,33	54,89	23,47	1645,56	435,59
<b>15 : 85</b>	6,16	7,09	29,18	2101,00	61,54	113,85	220,56	83,32	827,65	250,80
<b>10 : 90</b>	7,32	8,74	37,19	6,84	57,92	463,33	499,96	171,04	860,29	821,18
<b>5 : 95</b>	12,61	9,74	44,92	230,60	69,25	185,73	820,79	259,92	698,23	569,61

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Da Lysin und Lys-Ala unter den in Abschnitt 4.3.2.1. dargestellten Bedingungen nicht retiniert wurden, wiesen die Retentionsfaktoren Werte von annähernd 0 auf. Dadurch ergaben sich rechnerisch Separationsfaktoren, die Werte zwischen 6,16 und 1645,56 aufwiesen. Auf

allen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren konnte mit steigendem Wasser-Anteil in der Acetonitril/Wasser-Mischung eine zunehmende Separation beobachtet werden. Des Weiteren nahm die Separation mit zunehmender Länge bzw. Größe der geprägten Aminosäuresequenz zu, so dass die größte Nisin-Separation auf den Polymeren P(Lys-Ala-Val) und P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val) erzielt wurde. Eine Basislinientrennung konnte auf Grund der höheren Nisin-Retention im Vergleich zu den nicht retenierten Molekülen Lysin und Lys-Ala erreicht werden (Abb. 4-25).

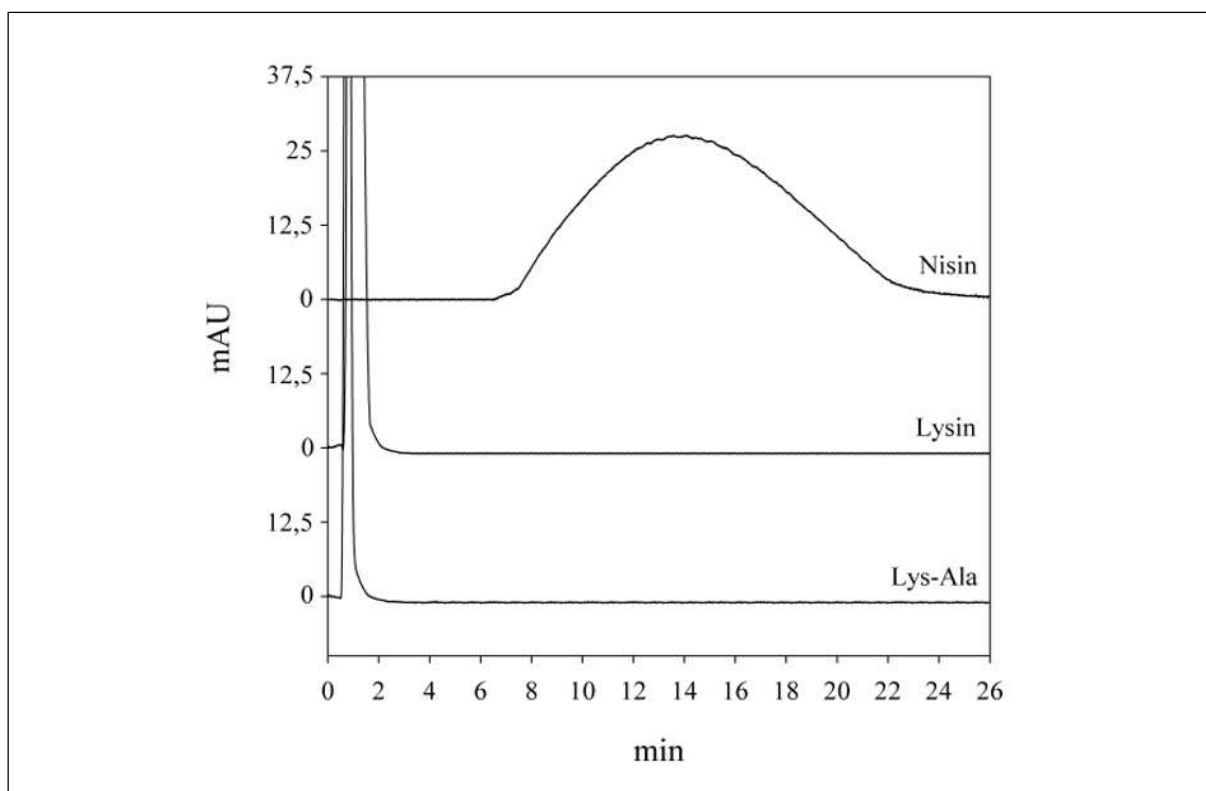


Abb. 4-25: Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(Lys-Ala-Val) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (5:95; v/v) als mobile Phase; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

#### 4.3.2.4. C-Terminus und C-terminal analoge Aminosäuresequenzen des Nisins

##### 4.3.2.4.1. Retention von Lysin und Lys-Ala

Auf dem Polymer P(Lys) wurden, wie in den Abbildungen 4-26 a – b dargestellt, verschiedene mobile Phasen getestet, um deren Einfluss auf die Retention von Lysin und Lys-Ala zu untersuchen. Beim Lysin handelt es sich um den C-Terminus des Nisins und Lys-Ala

ist eine Nisin C-terminal analoge Dipeptidsequenz. Da Lys-Ala die freie Aminogruppe am Lysin-Rest trägt, stellt dieses Dipeptid die Prägungssequenz des Polymers P(Lys-Ala) dar (siehe auch Abschnitt 3.2.3.).

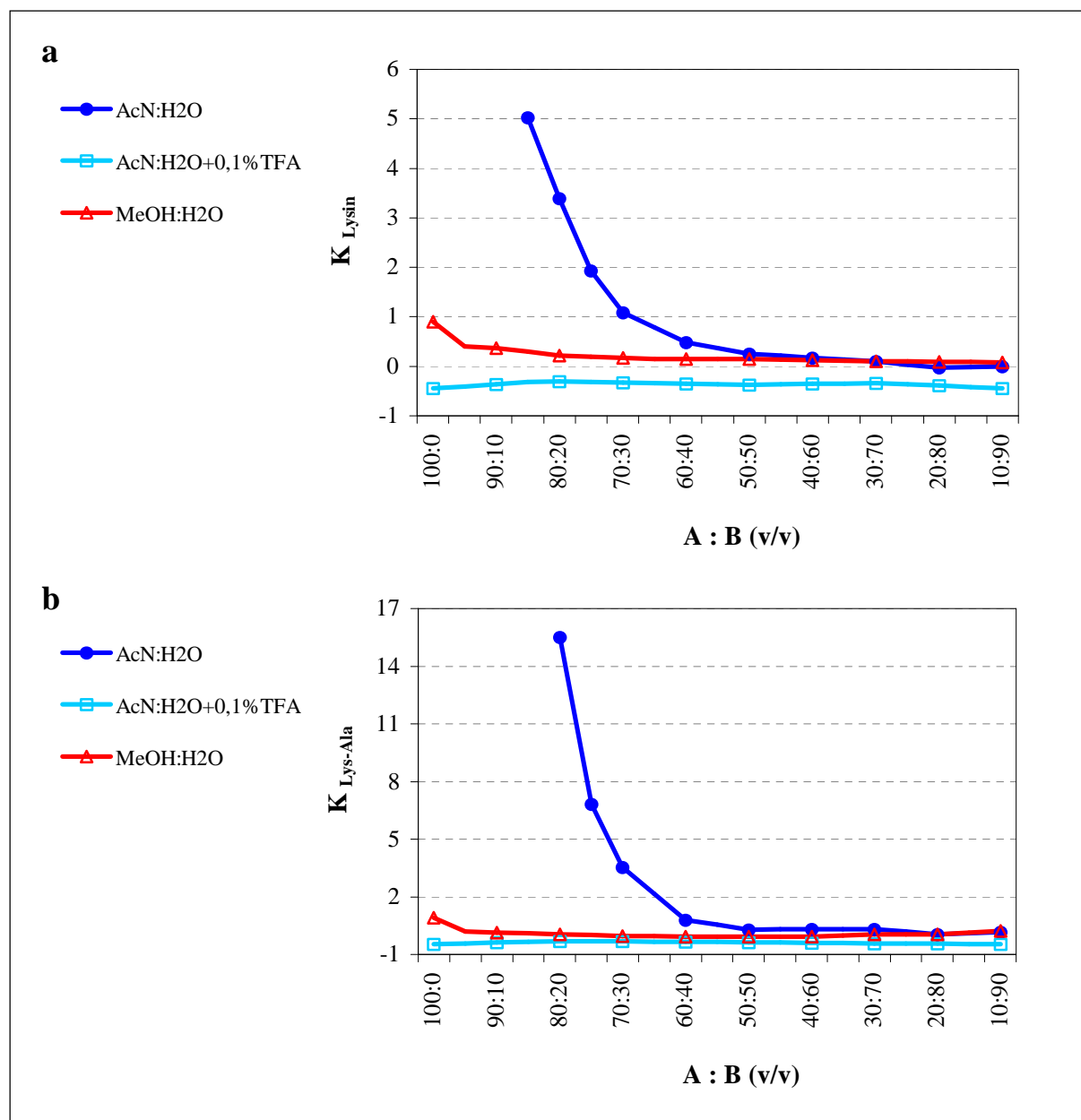


Abb. 4-26: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Lysins (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Lys-Ala (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b) auf dem Polymer P(Lys) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B =  $\text{H}_2\text{O}$ ); HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Diente eine Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase, konnte mit abnehmendem Wasser-Gehalt eine zunehmende Affinität des Polymers P(Lys) zum Lysin und Lys-Ala

beobachtet werden. Betrug der Wasser-Anteil mehr als 30% in der Acetonitril/Wasser-Mischung, wurden Lysin und Lys-Ala vom P(Lys) nicht reteniert. Bei einem Wasser-Anteil kleiner 15% bzw. 20% eluierten Lysin bzw. Lys-Ala, auf Grund ihrer geringen Löslichkeit in apolareren Lösemitteln nicht von der Säule. In Methanol/Wasser-Mischungen oder Acetonitril/Wasser-Mischungen, die 0,1% TFA enthielten, retenierte das MIP Lysin und Lys-Ala nicht. Auf Grund der abnehmenden Retentionsfähigkeit mit steigendem Wasser-Gehalt in der mobilen Phase sowie der nicht vorhandenen Retentionsfähigkeit unter Anwesenheit von Methanol oder TFA wird verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen überwiegend auf ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen beruhten. Die in der Literatur dargestellte Peptid-Retention auf entsprechend geprägten Polymeren, basierte in nicht polaren Lösemitteln ebenfalls überwiegend auf ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen, so dass die Retention unter Zugabe von Wasser oder Säure zum nicht polaren Lösemittel abnahm (Nicholls et al., 1995; Rachkov & Minoura, 2000).

Basierend auf den hier vorliegenden Ergebnissen dienten als mobile Phasen für die nachstehenden Untersuchungen zur Separation von Lysin und Lys-Ala Acetonitril/Wasser-Mischungen, die ein Verhältnis zwischen 85:15 (v/v) und 70:30 (v/v) aufwiesen. In den Abbildungen 4-27 a – b sind die Retentionsfaktoren von Lysin und Lys-Ala auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren dargestellt. Auf allen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren konnte mit abnehmendem Wasser-Anteil in der Acetonitril/Wasser-Mischung eine zunehmende Lysin- und Lys-Ala-Retention beobachtet werden. Die größten Retentionsfaktoren für Lysin bzw. Lys-Ala wurden somit mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung, die ein Volumenverhältnis von 85:15 bzw. 80:20 aufwies, erzielt. Weiterhin wurde deutlich, dass mit zunehmender Länge bzw. Größe der geprägten C-terminal analogen Nisin-Sequenz die Retention abnahm, wobei dies beim Lys-Ala stärker ausgeprägt war als beim Lysin. Die größte Affinität zum Lysin und Lys-Ala zeigten daher die Polymere P(Lys) und P(Lys-Ala). Das NIP retenierte Lysin und Lys-Ala nicht. Lys-Ala wurde mit einem maximalen Retentionsfaktor von 15,45 stärker reteniert als Lysin, für das nur ein maximaler Retentionsfaktor von 5,03 erreicht wurde.

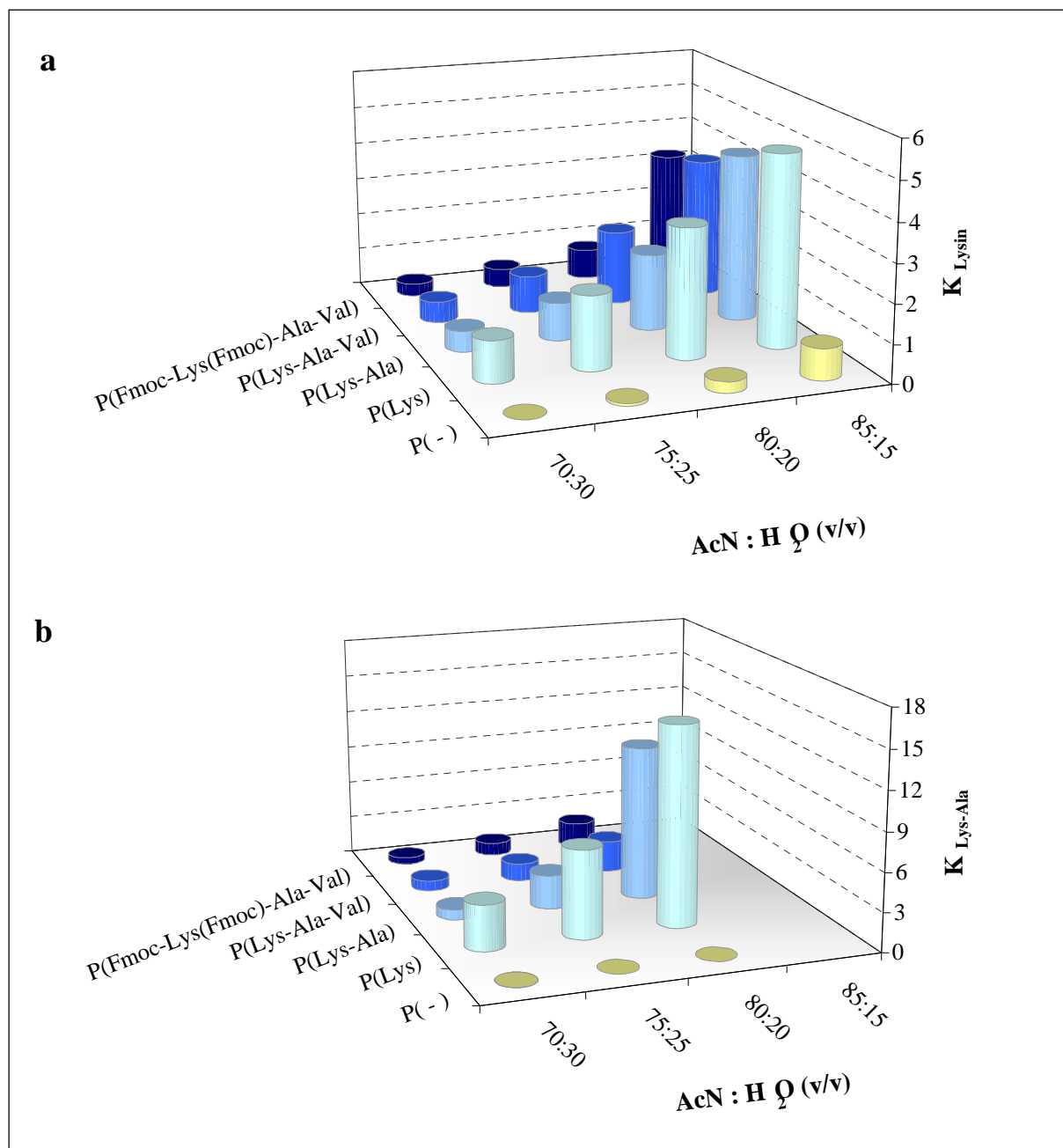


Abb. 4-27: Retentionsfaktoren ( $K$ ) des Lysins (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Lys-Ala (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

#### 4.3.2.4.2. Prägungseffekt gegenüber Lysin und Lys-Ala

Die Tabelle 4-37 zeigt die Prägungsfaktoren für Lysin und Lys-Ala auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren.



Tab. 4-37: Prägungsfaktoren des Lysins (10 µmol/ml) und Lys-Ala (1 µmol/ml) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren

Polymer	P(Lys)		P(Lys-Ala)		P(Lys-Ala-Val)		P(Fmoc-Lys (Fmoc)-Ala-Val)	
	IF <sub>Lys</sub>	IF <sub>Lys-Ala</sub>	IF <sub>Lys</sub>	IF <sub>Lys-Ala</sub>	IF <sub>Lys</sub>	IF <sub>Lys-Ala</sub>	IF <sub>Lys</sub>	IF <sub>Lys-Ala</sub>
AcN:H <sub>2</sub> O (v/v)								
<b>85 : 15</b>	6,14	–	5,38	–	4,51	–	4,00	–
<b>80 : 20</b>	11,60	322,91	6,88	249,79	6,69	51,33	2,72	40,38
<b>75 : 25</b>	25,49	155,18	13,13	59,80	13,08	31,27	6,52	22,46
<b>70 : 30</b>	45,46	253,50	22,51	56,57	23,05	56,88	13,83	36,94

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1..

Auf Grund der berechneten Prägungsfaktoren konnte die Lysin-Retention auf die molekulare Prägung zurückgeführt werden. Da die Retentionsfaktoren des Lysins mit steigendem Wasser-Gehalt in der mobilen Phase auf dem NIP gegen 0 tendierten, nahm der Prägungsfaktor mit steigendem Wasser-Anteil zu, obwohl auch auf den MIPs die Retention deutlich abnahm. Die Lys-Ala-Retention basierte ebenfalls auf der molekularen Prägung, so dass der Prägungseffekt wie auch die Retention mit steigendem Wasser-Gehalt in der mobilen Phase abnahm. Da das NIP Lys-Ala nicht retenierte, wiesen die Retentionsfaktoren Werte von annähernd 0 auf. Dies führte zu Prägungsfaktoren, die Werte bis 323 aufwiesen. Des Weiteren ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Länge bzw. Größe der geprägten C-terminal analogen Nisin-Sequenz der Prägungseffekt gegenüber Lysin und Lys-Ala abnahm, so dass die größten Prägungsfaktoren auf den Polymeren P(Lys) und P(Lys-Ala) erzielt wurden. Die selektive Bindung an die geprägten Kavitäten war bei dem größeren Zielanalyten Lys-Ala im Vergleich zu dem kleineren Zielanalyten Lysin stärker ausgeprägt.

Das nachstehende Beispiel zur Berechnung eines Prägungsfaktors, wobei als stationäre Phase P(Lys-Ala-Val) und als mobile Phase Acetonitril/Wasser im Verhältnis 70:30 (v/v) diene, soll verdeutlichen, dass ein Prägungsfaktor immer im Zusammenhang mit dem Retentionsfaktor betrachtet werden muss:

$$IF_{\text{Lys-Ala}} = K_{\text{P(Lys-Ala-Val)}} / K_{\text{P(-)}} \rightarrow 56,88 = 0,796 / 0,014$$

Hier konnte zwar ein Prägungsfaktor von 56,88 berechnet werden, da aber die Retention mit einem Retentionsfaktor von 0,80 gering war und somit nahe dem Ausschlussvolumen eluierte, hat der hohe Prägungsfaktor für weitere Anwendungen keine Bedeutung.

### 4.3.2.4.3. Separation von Lysin und Lys-Ala

Die Abbildung 4-28 zeigt die Retentionsfaktoren von Ala-Lys auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren. Ala-Gly ist die inverse Dipeptidsequenz des Lys-Ala, so dass im Gegensatz zum Lys-Ala, das am Lysin-Rest eine freie Aminogruppe besitzt, sich beim Ala-Lys eine freie Carboxylgruppe am Lysin-Rest befindet. Dies entspricht der C-terminalen Sequenz des Nisins, da auch hier der C-Terminus Lysin eine freie Carboxylgruppe trägt.

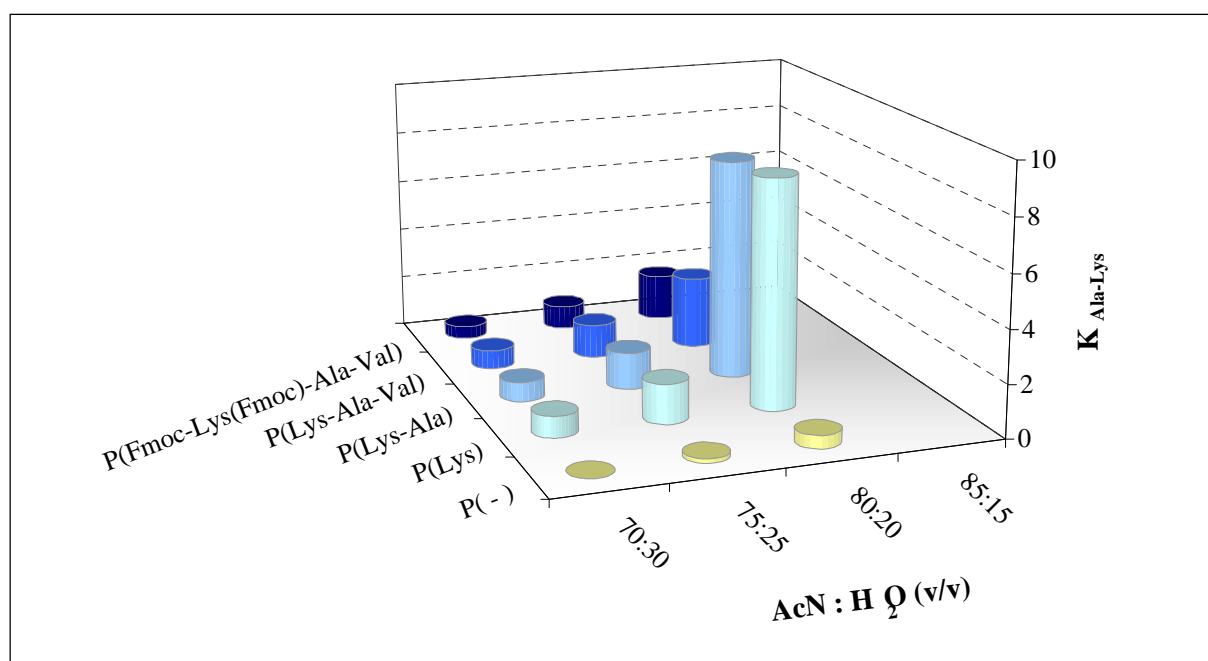


Abb. 4-28: Retentionsfaktoren (K) des Ala-Lys (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Mit abnehmendem Wasser-Gehalt in der Acetonitril/Wasser-Mischung konnte eine zunehmende Retention von Ala-Lys festgestellt werden. Bei einem Wasser-Gehalt weniger als 20%, wurde Ala-Lys, auf Grund dessen geringer Löslichkeit in der mobilen Phase, nicht von der Säule eluiert. Somit wurde auf allen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren eine maximale Retention des Ala-Lys unter Verwendung einer Acetonitril/Wasser-Mischung, die ein Volumenverhältnis von 80:20 aufwies, erreicht. Weiterhin nahmen mit zunehmender Länge bzw. Größe der geprägten C-terminal analogen Nisin-Sequenz die Retentionsfaktoren von Ala-Lys ab. Demnach wurden die höchsten Retentionsfaktoren auf dem Polymer P(Lys)

erzielt. Das NIP retinierte Ala-Lys nicht. Das Retentionsvermögen der Nisin C-terminal analog geprägten Polymere war somit für Ala-Lys vergleichbar mit den geprägten Verbindungen Lysin und Lys-Ala. Ala-Lys wurde allerdings geringer als Lys-Ala und stärker als Lysin retiniert.

In den Tabellen 4-38 und 4-39 sind die Separationsfaktoren des Lysins und Lys-Ala dargestellt.

Tab. 4-38: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Lysins (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Lys-Ala (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Ala-Lys (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren

Polymer	P(–)		P(Lys)		P(Lys-Ala)		P(Lys-Ala-Val)		P(Fmoc-Lys (Fmoc)-Ala-Val)	
AcN:H <sub>2</sub> O (v/v)	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys-Ala}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$
<b>85 : 15</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>80 : 20</b>	6,08	0,59	0,14	0,26	0,17	0,24	0,79	0,71	0,41	0,45
<b>75 : 25</b>	1,73	0,45	0,16	0,71	0,38	0,71	0,72	0,77	0,50	0,56
<b>70 : 30</b>	1,71	12,00	0,65	0,71	0,68	0,73	0,69	0,78	0,64	0,69

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1..

Tab. 4-39: Separationsfaktoren ( $\alpha$ ) des Lys-Ala (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) bezogen auf Lysin (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Ala-Lys (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren

Polymer	P(–)		P(Lys)		P(Lys-Ala)		P(Lys-Ala-Val)		P(Fmoc-Lys (Fmoc)-Ala-Val)	
AcN:H <sub>2</sub> O (v/v)	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$	$\alpha_{\text{Lys}}$	$\alpha_{\text{Ala-Lys}}$
<b>85 : 15</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>80 : 20</b>	0,16	0,10	6,94	1,78	5,97	1,43	1,26	0,89	2,44	1,10
<b>75 : 25</b>	0,58	0,26	6,25	4,42	2,64	1,88	1,38	1,07	2,00	1,11
<b>70 : 30</b>	0,58	7,00	1,53	1,09	1,47	1,08	1,44	1,13	1,56	1,08

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1..

Die Separation des Lysins von den Lysin enthaltenden Dipeptiden nahm mit zunehmendem Wasser-Gehalt sowie mit zunehmender Länge bzw. Größe der Nisin C-terminal analog geprägten Sequenz ab. Da Lysin von den Nisin C-terminal analog geprägten Polymeren geringer retiniert wurde als Lys-Ala oder Ala-Lys, wiesen die Separationsfaktoren Werte

kleiner 1 auf. Weiterhin wurde Lys-Ala und Ala-Lys nicht von der Säule eluiert, wenn als mobile Phase eine Acetonitril/Wasser-Mischung mit dem Volumenverhältnis 85:15, unter dem maximale Retentions- und Prägungsfaktoren für Lysin erreicht wurden, diente. Das Dipeptid Lys-Ala wurde stärker reteniert als Lysin und Ala-Lys, auf Grund dessen die Separationsfaktoren Werte größer 1 aufwiesen. In der mobilen Phase Acetonitril/Wasser 80:20 (v/v), bei der die maximalen Retentions- und Prägungsfaktoren für Lys-Ala erzielt werden konnten, wurde Lysin mit einem maximalen Separationsfaktor von 6,94 deutlich stärker vom Lys-Ala separiert als Ala-Lys, dessen maximaler Separationsfaktor nur einen Wert von 1,78 aufwies.

In der Abbildung 4-29 ist die Separation des Lysins und Lys-Ala bezogen auf Ala-Lys dargestellt.

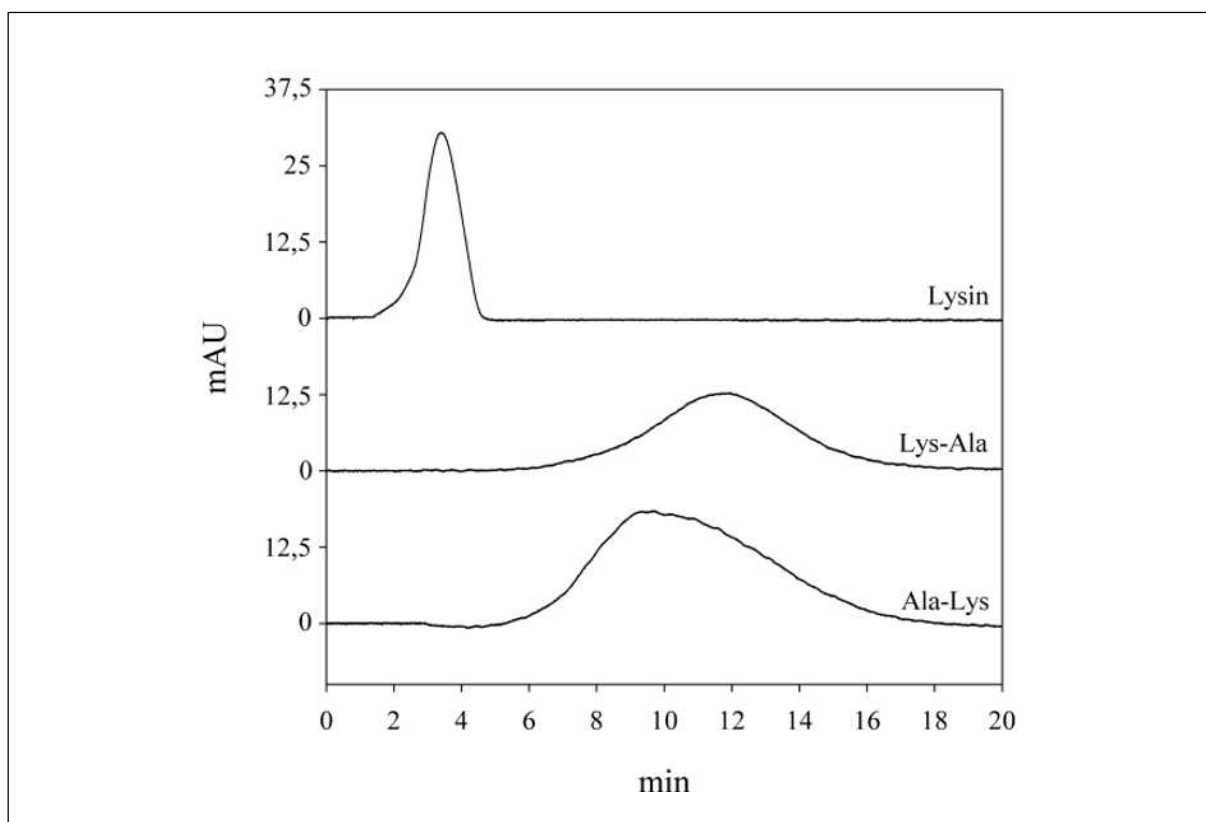


Abb. 4-29: Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers P(Lys) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (80:20; v/v) als mobile Phase; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Da retenierte Verbindungen als breite Peaks eluieren, konnte zwischen Lys-Ala und Ala-Lys keine Basislinientrennung erreicht werden. Zwischen Lysin und Lys-Ala sowie Ala-Lys

konnte eine Basislinientrennung erzielt werden, wenn als mobile Phase eine Acetonitril/Wasser-Mischung im Verhältnis 80:20 (v/v) verwendet wurde.

##### **4.3.2.5. Zusammenfassende Betrachtung**

Da im Gegensatz zu den MIPs das NIP die Zielanalyten Nisin, Lysin und Lys-Ala nicht retinierte, basierte deren Retention auf selektiven Wechselwirkungen mit den molekular geprägten Kavitäten. Für eine maximale Retention war eine sorgfältige Wahl der mobilen Phase notwendig. Beispielsweise verhinderte die Zugabe von TFA die Retention des Nisins aber auch von Lysin und Lys-Ala. Weiterhin wurden für Nisin nur mit Acetonitril/Wasser-Mischungen, die einen Wasser-Anteil größer 80% aufwiesen, maximale Retentions- und Prägungsfaktoren erreicht. Dagegen musste die Acetonitril/Wasser-Mischung weniger als 25% Wasser enthalten, um für Lysin und Lys-Ala maximale Retentionsfaktoren zu erzielen. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen der Literatur kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Retention des kationischen Peptids Nisin unter wässrigen Elutionsbedingungen auf selektiven ionischen sowie hydrophoben Wechselwirkungen basierte (Rachkov & Minoura, 2000; Rachkov & Minoura, 2001; Rachkov et al., 2004). Dagegen beruhte die Retention des Lysins und Lys-Ala unter den weniger polaren Elutionsbedingungen überwiegend auf selektiven ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (Nicholls et al., 1995; Rachkov & Minoura, 2000).

Die Länge bzw. Größe der geprägten Nisin C-terminal analogen Sequenz wirkte sich ebenfalls unterschiedlich auf die Retention des Nisins sowie Lysins und Lys-Ala aus. Nisin wurde von den Polymeren, die mit einer längeren bzw. größeren Sequenz geprägt waren, stärker retiniert, wobei eine maximale Retention auf den Polymeren P(Lys-Ala-Val) und P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val) erzielt wurde. Bei diesen Polymeren waren die Bindungskavitäten größer als beim P(Lys) und P(Lys-Ala), so dass eine bessere sterische Zugänglichkeit des C-terminalen Endes vom Nisin in den Bindungskavitäten bestand. Die Retention von Lysin und Lys-Ala nahm dagegen mit zunehmender Länge bzw. Größe der geprägten Sequenz ab, wobei das Dipeptid Lys-Ala stärker retiniert wurde als die Aminosäure Lysin. Folglich war das Dipeptid und besonders die Aminosäure in den größeren geprägten Kavitäten nicht mehr in der Lage, optimale Wechselwirkungen mit diesen einzugehen.

Die Aminosäurereste des Nisins bilden an den Positionen drei bis sieben einen intramolekularen Lanthionin-Ring, so dass die N-terminale Sequenz nur bis zum zweiten Aminosäurerest linear vorliegt (Hurst, 1981; Hansen, 1997). Deshalb wurde die C-terminale Nisin-Sequenz für die Epitop-Strategie gewählt. Da aber die Standardfestphasensynthese nach der Fmoc-Strategie nur vom C-terminalen Ende zum N-terminalen Ende eines Peptids erfolgen kann, war es notwendig, die C-terminal analoge Nisin-Sequenz umzudrehen (siehe Abschnitt 3.2.3.2.). Somit trug der hierarchisch geprägte terminale Lysin-Rest eine freie Aminogruppe. Am Nisin C-Terminus Lysin befindet sich jedoch eine freie Carboxylgruppe (Abb. 4-30). Durch das Retentionsverhalten der Nisin C-terminal analogen Dipeptide Lys-Ala und Ala-Lys wurde gezeigt, dass die inverse Aminosäuresequenz eine Verminderung der Wiedererkennungseigenschaften durch die molekular geprägten Kavitäten bewirkte. Ala-Lys, das wie der Nisin-Terminus eine freie Carboxylgruppe am Lysin-Rest hat, wurde geringer retiniert als Lys-Ala, das wie die Präguungssequenz am Lysin-Rest eine freie Aminogruppe trägt.

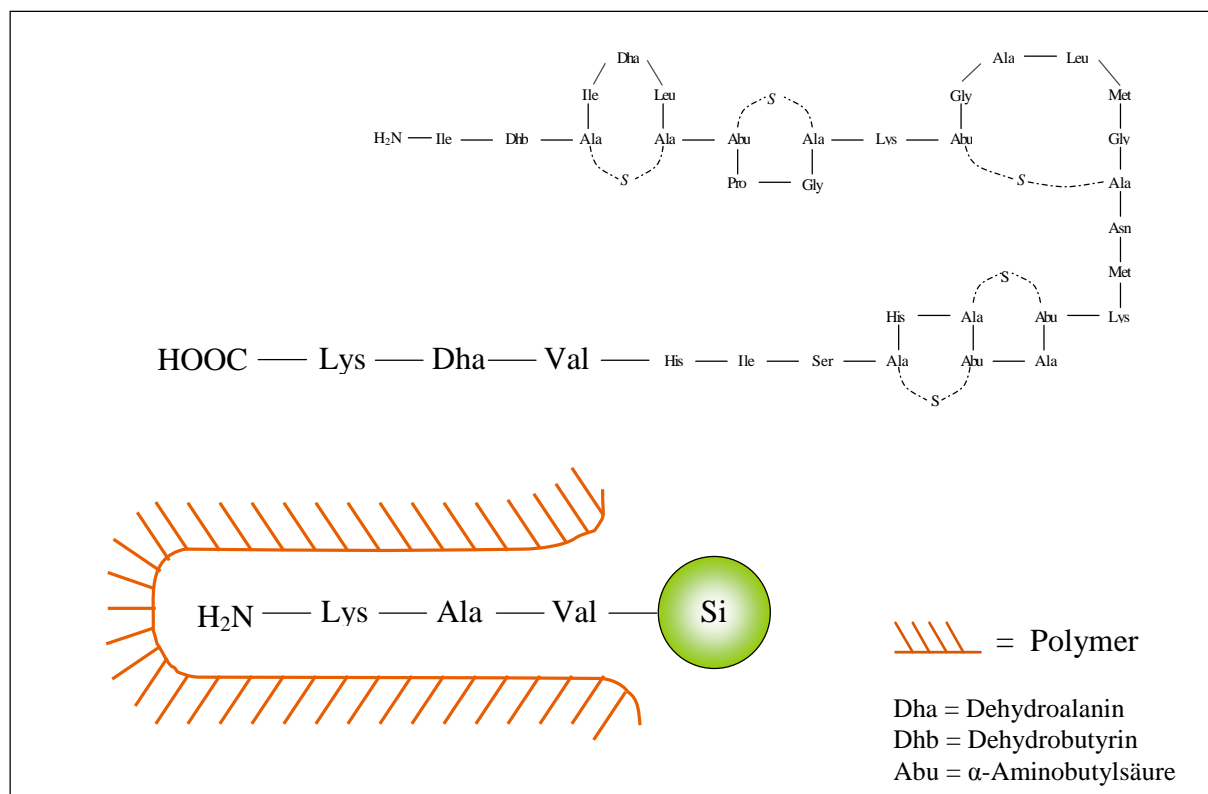


Abb. 4-30: Vergleich der C-terminalen Nisin-Sequenz mit der hierarchisch geprägten Sequenz

Die Anwendung von MIPs in der HPLC beinhaltet die Problematik von Peakasymmetrien sowie großer Peakbreiten, insbesondere wenn eine Testsubstanz vom Polymer reteniert wird (Kempe & Mosbach, 1995; Sellergren & Shea, 1995). Dies konnte auch bei den hier dargestellten Untersuchungen beobachtet werden. Diese Problematik ist jedoch für den Einsatz des hierarchisch geprägten Polymers P(Lys-Ala-Val) als Sorbent in der Festphasenextraktion mit dem Ziel der Abtrennung von Matrix sowie Aufkonzentrierung des Zielanalyten nicht von Bedeutung.

### **4.3.3. Manuelle Festphasenextraktion**

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen HPLC-Untersuchungen wurde als SPE-Sorbent das Polymer P(Lys-Ala-Val) verwendet. Auf dem Polymer P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val) konnte zwar eine etwas höhere Nisin-Retention als auf dem Polymer P(Lys-Ala-Val) erreicht werden, wobei allerdings die Peak-Breite deutlich höher war. Folglich lag die Peak-Startzeit auf dem P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val) vor der Peak-Startzeit, die auf dem P(Lys-Ala-Val) erzielt wurde.

#### **4.3.3.1. Standardverdünnungsreihe vom Nisin**

Die Standardverdünnungsreihe vom Nisin diente der Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze sowie in welchem Messbereich bei der RP18-HPLC Nisin, das über Festphasenextraktion eluierte, mit höchst möglicher Genauigkeit quantitativ bestimmt werden konnte. Die ermittelte lineare Kalibrierung sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sind in der Tabelle 4-40 und der Abbildung 4-31 dargestellt.

Tab. 4-40: Lineare Kalibrierung sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenze vom Nisin

<b>Kalibrationsbereich</b>	7,5 – 300 nmol/ml (25,16 – 1006,22 µg/ml)
<b>Injektionsvolumen</b>	10 µl
<b>Anzahl der Werte</b>	10
<hr/>	
<b>Lineare Kalibrierung</b>	
Geradengleichung $y = a + bx$	$y = 71465,05 + 77684,38x$
Korrelationskoeffizient (r)	0,9999
<hr/>	
<b>Nachweisgrenze</b>	
Nachweisgrenze *	2,44 nmol/ml (8,17 µg/ml)
Nachweisgrenze ‡	2,32 nmol/ml (7,77 µg/ml)
<hr/>	
<b>Bestimmungsgrenze</b>	
Bestimmungsgrenze *	8,32 nmol/ml (27,90 µg/ml)
Bestimmungsgrenze ‡	7,72 nmol/ml (25,89 µg/ml)

\* berechnet nach DIN 32645; ‡ berechnet nach Kromidas, 1999, S. 179

HPLC-Bedingungen zur Erstellung der Standardverdünnungsreihe siehe Abschnitt 3.2.4.2..

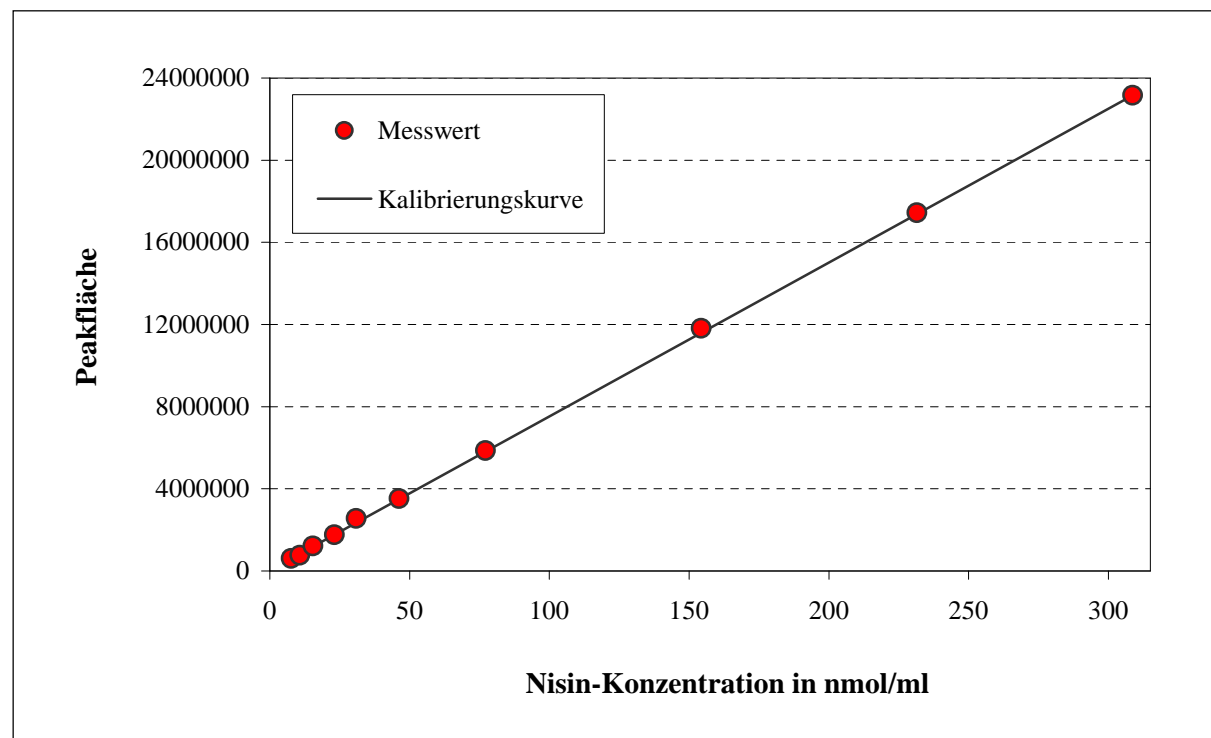


Abb. 4-31: Kalibrierungskurve vom Nisin; HPLC-Bedingungen zur Erstellung der Standardverdünnungsreihe siehe Abschnitt 3.2.4.2.



Eine lineare Korrelation ( $r = 0,9999$ ) der Peakfläche mit der aufgespritzten Konzentration, wobei das Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$  umfasste, bestand bei Konzentrationen zwischen 7,5 nmol/ml (25,16  $\mu\text{g/ml}$ ) und 300 nmol/ml (1006,22  $\mu\text{g/ml}$ ). Folglich mussten die Proben, die mit RP18-HPLC analysiert wurden, eine Nisin-Konzentration zwischen 7,5 nmol/ml und 300 nmol/ml aufweisen.

### 4.3.3.2. Waschen mit wässrigen Lösemittelmischungen

Die Tabelle 4-41 enthält die Nisin-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion, wobei mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung im Verhältnis 5:95 (v/v) gewaschen wurde. Unter Verwendung dieser Waschlösung sollte der Prägungseffekt des Polymers P(Lys-Ala-Val) gegenüber dem Nisin während des Waschens genutzt werden.

Tab.4-41: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Nisin-Lösung (15 nmol/ml) unter Verwendung der Acetonitril/Wasser-Mischung (5:95; v/v) als Waschlösung

Waschlösung AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	Nisin-Wiederfindung (%)				Summe
	1. Waschen (1 ml)	2. Waschen (1 ml)	3. Waschen (1 ml)	Elution	
<b>5 : 95</b>	73,7 $\pm$ 6,65	0,0 $\pm$ 0,00	0,0 $\pm$ 0,00	<b>0,0 <math>\pm</math> 0,00</b>	73,7

SPE-Bedingungen: 15 nmol Nisin gelöst in 1 ml AcN:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg P(Lys-Ala-Val); Konditionierung mit 2 ml Acetonitril und 2 ml AcN:H<sub>2</sub>O (5:95; v/v); Elution mit 3 ml Methanol + 0,1% HCl; MW  $\pm$  STDW (n = 2); HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Nisins siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Diente als Waschlösung eine Acetonitril/Wasser-Mischung mit einem Wasser-Anteil von 95%, unter der bei der chromatographischen Evaluierung die höchsten Retentionsfaktoren erzielt wurden (siehe Abschnitt 4.3.2.1.), eluierte Nisin mit den ersten Millilitern der Waschlösung von der Kartusche. Offensichtlich waren die Wechselwirkungen, die zwischen dem Zielanalyten Nisin und dem hierarchisch geprägten Polymer unter wässrigen Bedingungen herrschten, für diese Anwendung nicht ausreichend.

#### 4.3.3.3. Waschen mit Acetonitril und Acetonitril mit geringem Wasser-Anteil

In der Tabelle 4-42 sind die Nisin-Wiederfindungen nach Festphasenextraktion dargestellt, wobei mit Acetonitril oder Acetonitril, das geringe Mengen Wasser enthielt, gewaschen wurde. Es wurde die begrenzte Löslichkeit des Nisins in diesen Lösemitteln genutzt.

Tab. 4-42: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Nisin-Lösung (15 nmol/ml) unter Verwendung von Acetonitril oder Acetonitril mit geringen Wasser-Anteil als Waschlösung

Waschlösung AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	Nisin-Wiederfindung (%)		
	Waschen	Elution	Summe
<b>100 : 0</b>	0,0 ± 0,00	<b>58,2 ± 6,84</b>	58,2
<b>97,5 : 2,5</b>	0,0 ± 0,00	<b>59,1 ± 14,06</b>	59,1
<b>95 : 5</b>	0,0 ± 0,00	<b>68,8 ± 10,91</b>	68,8
<b>92,5 : 7,5</b>	0,0 ± 0,00	<b>65,5 ± 7,50</b>	65,5
<b>90 : 10</b>	10,2 ± 3,59	<b>58,7 ± 6,62</b>	68,9
<b>87,5 : 12,5</b>	66,9 ± 4,88	<b>0,0 ± 0,00</b>	66,9

SPE-Bedingungen: 15 nmol Nisin gelöst in 1 ml AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (95:5; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg P(Lys-Ala-Val); Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril; Waschen mit 10 ml Waschlösung; Elution mit 3 ml Methanol + 0,1% HCl; MW ± STDW (n = 3 (97,5:2,5; 95:5; 92,5:7,5) oder n = 2 (100:0; 90:10; 87,5:12,5)); HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Nisins siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Auf Grund der geringen Nisin-Löslichkeit in apolareren Lösemitteln eluierte Nisin bei der chromatographischen Evaluierung nicht von der Säule, wenn der Acetonitril-Anteil in der mobilen Phase mehr als 70% betrug (siehe Abschnitt 4.3.2.1.). Daher war es notwendig, die Proben für die Festphasenextraktion mit 0,1% HCl zu versetzen, um durch die Erniedrigung des pH-Wertes eine Erhöhung der Nisin-Löslichkeit in der Probenlösung zu erreichen. Bei einem Wasser-Gehalt in der Waschlösung von weniger als 10% wurden Nisin-Wiederfindungen zwischen 50,6% und 68,8% erzielt. Die verminderte Wiederfindung konnte aber nicht durch Nisin-Verluste während des Waschens erklärt werden, da in den eluierten Waschlösungen kein Nisin nachweisbar war. Enthielt die Acetonitril/Wasser-Mischung 10% Wasser, eluierte bereits während des Waschens etwa 10% des aufgetragenen Nisins von der Kartusche. Bei Wasser-Anteilen größer 10% in der Waschlösung eluierte das gesamte Nisin während des Waschschrilles von der Kartusche, so dass nach Elution mit Methanol kein Nisin detektierbar war.

Für die folgenden Untersuchungen wurde als Waschlösung eine Acetonitril/Wasser-Mischung im Verhältnis 95:5 (v/v) verwendet, da diese die höchste Wiederfindung ergab.

### 4.3.3.4. Waschen mit Acetonitril/Wasser (95:5; v/v)

#### 4.3.3.4.1. Einfluss der Nisin-Konzentration auf die Wiederfindung

Die Tabelle 4-43 zeigt die Nisin-Wiederfindungen nach einer Festphasenextraktion mit Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) als Waschlösung in Abhängigkeit von der Konzentration.

Tab. 4-43: Wiederfindung nach Festphasenextraktion von Nisin-Lösungen verschiedener Konzentration unter Verwendung der Acetonitril/Wasser-Mischung (95:5; v/v) als Waschlösung

c Nisin (nmol/ Probenvolumen)	Nisin-Wiederfindung (%)					
	3	6	9	12	15	30
1. Versuch	71,1	71,5	74,2	68,1	64,8	63,4
2. Versuch	51,4	66,0	67,0	60,2	58,9	60,8
3. Versuch		57,2	61,7			
4. Versuch		58,1	61,4			
MW	61,2	63,2	66,1	64,2	61,9	62,1
STDW	13,94	6,78	6,03	5,55	4,17	1,84

SPE-Bedingungen: Nisin gelöst in 1 ml AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (95:5; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg P(Lys-Ala-Val); Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril; Waschen mit 5 ml AcN:H<sub>2</sub>O (95:5; v/v); Elution mit 3 ml Methanol + 0,1% HCl; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Nisins siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Von allen aufgebrauchten Nisin-Konzentrationen wurde nach Waschen mit 5 ml Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) und Elution mit Methanol + 0,1% HCL eine Wiederfindung zwischen 51,4% und 74,2% ermittelt. Somit konnte keine verringerte Wiederfindung bei höherer Konzentration festgestellt werden. Allerdings zeigte sich mit Standardabweichungen, die Werte bis 13,94 aufwiesen, dass die Nisin-Wiederfindung höheren Schwankungen unterlag. Dies ist auf die begrenzte Stabilität des Nisins in Lösung sowie unter erhöhten Temperaturen, wie sie bei der Trocknung im Vakuum-Konzentrator auftreten können, zurückzuführen (siehe Abschnitt 3.2.5.). Daher könnte unter Verwendung einer online-

Festphasenextraktion, anstelle der manuellen Festphasenextraktion durch die resultierende Minimierung der Probenaufbereitungsschritte, eine Verbesserung der Wiederfindung erreicht werden.

##### 4.3.3.4.2. Einfluss des Volumens der Waschlösung auf die Wiederfindung

Die Tabelle 4-44 zeigt die Nisin-Wiederfindungen nach einer Festphasenextraktion mit Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) als Waschlösung in Abhängigkeit vom Volumen der Waschlösung.

Tab. 4-44: Wiederfindung nach Festphasenextraktion einer Nisin-Lösung (30 nmol/ml) unter Verwendung verschiedener Volumina der Waschlösung Acetonitril/Wasser (95:5; v/v)

Waschlösung Volumen (ml)	Nisin-Wiederfindung (%)	
	Waschen	Elution
10	0,0	55,2
20	0,0	53,2
30	0,0	55,6
40	0,0	59,7
50	0,0	57,2

SPE-Bedingungen: 30 nmol Nisin gelöst in 1 ml AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (95:5; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg P(Lys-Ala-Val); Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril; Waschen mit AcN:H<sub>2</sub>O (95:5; v/v); Elution mit 3 ml Methanol + 0,1% HCl; HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des eluierten Nisins siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Auch wenn mit hohen Volumina Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) gewaschen wurde, eluierte kein Nisin während des Waschschrilles von der Kartusche, so dass die Wiederfindungen nach Elution mit Methanol + 0,1% HCl zwischen 53,2% und 59,7% lagen. Dies bestätigt, dass die verminderten Wiederfindungen auf die Instabilität des Nisins zurückzuführen waren und nicht auf einer unvollständigen Elution vom MIP beruhten.

## 4.3.3.4.3. Einfluss der Verfahren zur Probenaufbereitung auf die Wiederfindung

In den nachstehenden Tabellen 4-45 und 4-46 ist aufgeführt, wie sich verschiedene Bedingungen für die Aufbereitung von Proben auf die Nisin-Wiederfindung nach HPLC-Analyse auswirkten. Als Homogenisierungslösung wurde eine Acetonitril/Wasser-Mischung im Verhältnis 60:40 (v/v) gewählt, da beispielsweise Käseproben nicht in einer Acetonitril/Wasser-Mischung, die ein Verhältnis von 95:5 (v/v) aufweist, homogenisierbar wären.

Tab. 4-45: Einfluss von Verfahren zur Probenaufbereitung auf die Nisin-Wiederfindung

Zeitpunkt der Quantifizierung	Nisin-Wiederfindung (%)	
	homog. bei RT im Ultraschallbad	homog. bei 37°C im Wasserbad
nach homogenisieren	100,6 ± 1,38	0,00 ± 0,00
nach zentrifugieren	99,9 ± 0,64	–
nach filtrieren	100,2 ± 0,23	–

Probenvorbereitung: 60 nmol Nisin gelöst in 2 ml AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (60:40; v/v); 30 min homogenisieren; 5 min zentrifugieren (10000 x g); Überstand durch Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm) filtrieren; MW ± STDW (n = 3); HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des Nisins siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Tab. 4-46: Einfluss von Proteinfällungsmethoden auf die Nisin-Wiederfindung

Fällungsreagenz	Nisin-Wiederfindung (%)	
	vor SPE	nach SPE
1 molare PCA	94,8 ± 2,57	30,7 ± 5,80
10%ige PTA	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
40%ige SSA	55,5 ± 1,74	55,2 ± 9,27
20%ige TCA	95,0 ± 0,66	40,5 ± 10,51

Probenvorbereitung: 150 nmol Nisin gelöst in 1 ml AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (60:40; v/v) vermischen mit 1 ml Fällungsreagenz gelöst in AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (60:40; v/v); Inkubation 30 min bei 4°C; Zentrifugation für 5 min bei 10000 x g; den Überstand direkt in ein Autosamplergefäß überführen oder 0,5 ml Überstand mit 3,5 ml AcN + 0,1% HCl auffüllen, so dass ein AcN:H<sub>2</sub>O-Verhältnis von 95:5 (v/v) resultierte

SPE-Bedingungen: 4 ml Probe gelöst in AcN:H<sub>2</sub>O + 0,1% HCl (95:5; v/v); Kartuschen gepackt mit 50 mg P(Lys-Ala-Val); Konditionierung mit 2 ml Wasser und 2 ml Acetonitril; Waschen mit 5 ml AcN:H<sub>2</sub>O (95:5; v/v); Elution mit 3 ml Methanol + 0,1% HCl; MW ± STDW (n = 3); HPLC-Bedingungen zur Bestimmung des Nisins siehe Abschnitt 3.2.4.2.

Erfolgte die Homogenisierung, das Zentrifugieren und Filtrieren bei Raumtemperatur, konnte keine Verminderung der Nisin-Wiederfindung beobachtet werden. Homogenisieren im Wasserbad bei 37°C hatte allerdings den kompletten Verlust an Nisin zur Folge, da Nisin unter erhöhten Temperaturen nicht stabil ist. Daraus folgend musste die Homogenisierung im Ultraschallbad bei Raumtemperatur erfolgen.

Die chromatographische Evaluierung (Abschnitt 4.3.2.1.) zeigte, dass durch Zugabe von 0,1% TFA zur Acetonitril/Wasser-Mischung Nisin auch bei Wasser-Anteilen kleiner 30% von der Säule eluierte, ohne dabei reteniert zu werden. Daher wurde die Nisin-Wiederfindung nach der Proteinfällung vor und nach der Festphasenextraktion bestimmt, um den Einfluss der Fällungssäuren, die sich auf Grund der Probenbehandlung noch in der Probenlösung befanden, auf die Festphasenextraktion des Nisins beurteilen zu können. Diente als Fällungsreagenz eine 10%ige PTA-Lösung, konnte nach der 30-minütigen Inkubationszeit kein Nisin im Überstand analysiert werden. Wurde die Nisin-Lösung mit einer 40%igen SSA-Lösung behandelt, verblieben 55% des Nisins in der Lösung. Nach Festphasenextraktion dieser Probe betrug die Nisin-Wiederfindung ebenfalls 55%, so dass die SSA-Reste in der Probenlösung keinen Einfluss auf die Festphasenextraktion hatten. Die Behandlung der Nisin-Lösung mit 1 molarer PCA- oder 20%iger TCA-Lösung hatte einen relativ geringen Nisin-Verlust zur Folge, so dass die Nisin-Menge im Überstand 95% der ursprünglichen Nisin-Konzentration entsprach. Allerdings betrug die Wiederfindung nach der Festphasenextraktion nur 31% bzw. 41%. Folglich beeinflussten die PCA- bzw. TCA-Reste in der Probenlösung die Festphasenextraktion des Nisins.

##### **4.3.3.5. Zusammenfassende Betrachtung**

Die Zusatzstoff-Zulassungsverordnung Anlage 5 Teil C gibt Maximalgehalte des Nisins in den jeweiligen Endprodukten, wie beispielsweise Schmelzkäse oder gereifter Käse, zwischen 3 mg/kg und 12,5 mg/kg vor (Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998 Teil I Nr. 8). Die ermittelte Bestimmungsgrenze für eine Nisin-Lösung, wobei das Injektionsvolumen 10 µl betrug und die Detektion nach HPLC mittels UV-Detektion bei 205 nm erfolgte, lag jedoch bei 25,16 mg/l (7,5 nmol/ml). Deshalb ist nach Festphasenextraktion eine Detektion mittels LC-MS/MS erforderlich. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Nisin erfüllten die geforderte Bestimmungsgrenze, wobei Pfeiffer und Orben (1997) eine

chromatographische Methode zur Bestimmung von Nisin in Wein entwickelten und bei einer Nachweisgrenze von 1mg/l lagen. Berger et al. (2005) detektierten Nisin im gereinigten Käseextrakt nach Trennung auf einer Polymerphase mittels Massenspektrometrie mit einer Bestimmungsgrenze zwischen 0,5 mg/kg bis 1 mg/kg.

Unter Verwendung der wässrigen Lösemittelmischung Acetonitril/Wasser (5:95; v/v) als Waschlösung konnte kein Nisin nach Elution mit Methanol detektiert werden, da Nisin während des Waschens von der Kartusche eluierte. Offensichtlich waren die selektiven ionischen sowie hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Nisin und den Bindungskavitäten an der Oberfläche des hierarchisch geprägten Polymers für die Anwendung als SPE-Sorbent nicht ausreichend. Dies kann dadurch verdeutlicht werden, dass unter wässrigen Elutionsbedingungen die Nisin-Retention auf den C-terminal analog geprägten Polymeren, mit einem maximalen Retentionsfaktor von 21,6, deutlich geringer war als die Chloramphenicol-Retention auf den Chloramphenicol geprägten Polymeren, wo Retentionsfaktoren über 100 erreicht werden konnten (Abschnitt 4.1.1. und Anhang A1). Mit Acetonitril oder Acetonitril, das weniger als 10% Wasser enthielt, in denen Nisin nur gering löslich ist, wurden Nisin-Wiederfindungen zwischen 50,6% und 68,8% erzielt. Die verminderte Wiederfindung muss auf die Instabilität des Nisins in Lösung sowie oberhalb Raumtemperatur, wie sie bei der Trocknung im Vakuum-Konzentrator auftreten können, zurückgeführt werden. Daher könnte unter Verwendung einer online-Festphasenextraktion, anstelle der manuellen Festphasenextraktion durch die resultierende Minimierung der Probenaufbereitungsschritte, eine Verbesserung der Wiederfindung erreicht werden.

Die vorliegenden Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass das C-terminal analog geprägte Polymer P(Lys-Ala-Val) zur Festphasenextraktion von Nisin anwendbar ist. Ungeachtet davon bleibt aber die Problematik der geringen Nisin-Stabilität bestehen.

### 4.4. Ala-Gly geprägte Polymere zur Separation von Ala-Gly

Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse sind in Hinblick auf in Zukunft geplante Synthesen und Verwendungen von MIPs zur Bestimmung von bioaktiven Peptiden von Bedeutung. Dabei war der Einfluss der Fmoc-Schutzgruppe auf die Generierung selektiver Wechselwirkungen innerhalb der Kavitäten der MIPs von besonderem Interesse. Das Dipeptid Ala-Gly ist Bestandteil von mehreren bioaktiven Oligopeptiden, wie ACE-Inhibitoren oder zytomodulierenden Peptiden (US Patent 20040072341; Meisel et al., 2006). Oligopeptide können aber auf Grund ihrer Größe nicht durch die hochvernetzte Matrix eines beispielsweise Bulk-Polymers diffundieren und daher nicht die Bindungsstellen erreichen (Ye & Mosbach, 2001). Deshalb wurde zur Synthese der Polymere, die eine Affinität gegenüber Ala-Gly hatten, die Methode der hierarchischen Prägung angewendet (Abschnitt 2.1.6.2.2. und 3.2.3.). Dabei wurde die entsprechende Aminosäuresequenz mittels der Fmoc-Strategie an die Oberfläche des Silicagelträgers immobilisiert, so dass nach Polymerisation in den Silicagelporen Polymerpartikel resultierten, bei denen die molekular geprägten Bindungsstellen auf der Oberfläche lokalisiert waren (Yilmaz et al., 2000; Titirici et al., 2002; Titirici et al., 2003; Titirici & Sellergren, 2004).

#### 4.4.1. Elementaranalyse

Zur Kontrolle der einzelnen Syntheseschritte der hierarchischen Prägung wurde der Stickstoff- und Kohlenstoff-Gehalt durch Elementaranalyse für alle Vorstufen der Polymere  $P_B(-)$ ,  $P_B(\text{Ala-Gly})$  und  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  bestimmt. Dies ist in der Tabelle 4-47 dargestellt.



Tab. 4-47: Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalt der hierarchisch geprägten Polymere  $P_B(-)$ ,  $P_B(\text{Ala-Gly})$  und  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  sowie deren Vorstufen

Polymervorstufe bzw. Polymer	% C	% N
Silicagel B <sup>‡</sup>	4,61	1,28
– Si <sub>B</sub>	4,61	1,28
G <sub>B</sub> (– Si)	30,65	0,72
P <sub>B</sub> (–)	59,59	0,10
H-Ala-Gly-Si <sub>B</sub>	7,21	2,39
P <sub>B</sub> (Ala-Gly)	59,03	0,50
Fmoc-Ala-Gly-Si <sub>B</sub>	6,69	2,06
G <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly-Si)	31,61	1,21
P <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly)	59,03	0,17

G = Silicagel/Polymer-Gemisch, P = Polymer; <sup>‡</sup> siehe Abschnitt 3.2.3.6. Tab. 3-2

Die Ala-Gly bzw. Fmoc-Ala-Gly modifizierten Silicagele wiesen höhere Kohlenstoff- und Stickstoff-Gehalte auf als das ursprüngliche APS-modifizierte Silicagel (siehe Abschnitt 3.2.3.6. Tab. 3-2 und Abschnitt 4.3.1.). Dies zeigt, dass das Templat erfolgreich an die Silicageloberfläche immobilisiert werden konnte. Die durch die Elementaranalyse ermittelten Kohlenstoff-Gehalte der Polymere zwischen 59,03% und 59,59% zeigten, dass das Silicagel erfolgreich aus dem Silicagel/Polymer-Gemisch gelöst werden konnte. Die Stickstoff-Gehalte der Polymere sind deutlich geringer als vom APS-modifizierten Silicagel. Dies kann darauf zurück geführt werden, dass beim Herauslösen des Silicagels gleichzeitig das immobilisierte Peptid größtenteils entfernt wurde.

## 4.4.2. Chromatographische Evaluierung

### 4.4.2.1. Retentionsfaktoren

#### 4.4.2.1.1. Retention von Alanin und Ala-Gly

In den Abbildungen 4-32 a – b sowie den Tabellen 4-48 und 4-49 sind die Retentionsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) des Alanins und Ala-Gly dargestellt, die auf den Polymeren  $P_B(-)$ ,  $P_B(\text{Ala-Gly})$  und  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  erzielt wurden.

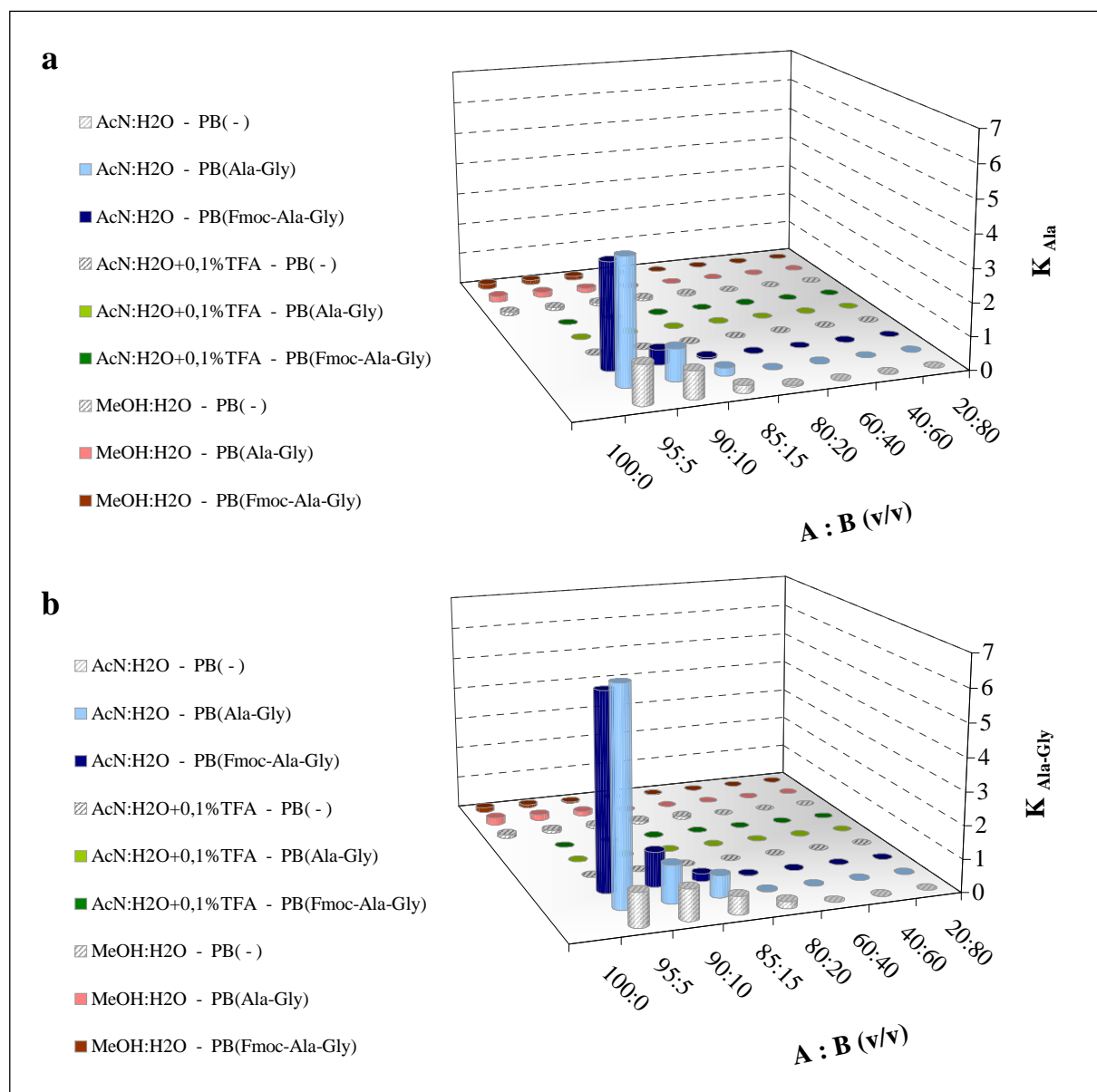


Abb. 4-32: Retentionsfaktoren (K) des Alanins (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Ala-Gly (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O) auf den hierarchisch geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-48: Retentionsfaktoren (K) des Alanins (10 µmol/ml) auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren

Polymer	$K_{\text{Ala}} - P_{\text{B}}(-)$		$K_{\text{Ala}} - P_{\text{B}}(\text{Ala-Gly})$		$K_{\text{Ala}} - P_{\text{B}}(\text{Fmoc-Ala-Gly})$	
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA
<b>mobile Phase (v/v)</b>						
<b>100 : 0</b>	—	—	—	—	—	—
<b>95 : 5</b>	1,20	-0,25	3,79	-0,23	3,23	-0,20
<b>90 : 10</b>	0,83	-0,24	0,98	-0,25	0,45	-0,20

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-49: Retentionsfaktoren (K) des Ala-Gly (1 µmol/ml) auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren

Polymer	$K_{\text{Ala-Gly}} - P_{\text{B}}(-)$		$K_{\text{Ala-Gly}} - P_{\text{B}}(\text{Ala-Gly})$		$K_{\text{Ala-Gly}} - P_{\text{B}}(\text{Fmoc-Ala-Gly})$	
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA
<b>mobile Phase (v/v)</b>						
<b>100 : 0</b>	—	—	—	—	—	—
<b>95 : 5</b>	1,03	-0,26	6,50	-0,22	5,96	-0,27
<b>90 : 10</b>	0,95	-0,27	1,16	-0,23	1,07	-0,26

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Diente eine Acetonitril/Wasser-Mischung als mobile Phase, konnte mit abnehmendem Wasser-Gehalt eine zunehmende Affinität der geprägten Polymere zum Alanin und Ala-Gly beobachtet werden. Bei einem Wasser-Anteil kleiner 5% eluierten Alanin und Ala-Gly, auf Grund deren eingeschränkter Löslichkeit in apolareren Lösemitteln, nicht von der Säule. Die größten Retentionsfaktoren wurden daher mit der Acetonitril/Wasser-Mischung (95:5; v/v) erzielt. Betrug der Wasser-Anteil mehr als 10% in der Acetonitril/Wasser-Mischung, wurden Alanin und Ala-Gly nicht reteniert. Somit bewirkte eine weitere Zugabe von Wasser bzw. 0,1% TFA zur mobilen Phase Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) eine Verschlechterung der Retention. Dies deutet darauf hin, dass die Alanin- und Ala-Gly-Retention auf ionische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen basierte (siehe auch Abschnitt 4.3.2.4.). In Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen, die 0,1% TFA enthielten, retenierten die Polymere Alanin und Ala-Gly nicht. Des Weiteren wurde deutlich, dass das Polymer  $P_{\text{B}}(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  die nicht Fmoc-geschützte Aminosäure bzw. das Peptid weniger retenierte als das Polymer  $P_{\text{B}}(\text{Ala-Gly})$ . Das NIP retenierte Alanin und Ala-Gly nicht. Ala-Gly wurde von den MIPs mit einem maximalen Retentionsfaktor von 6,50 stärker reteniert als Alanin, für das nur ein maximaler Retentionsfaktor von 3,79 erreicht werden konnte.

## 4.4.2.1.2. Retention von Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly

In den Abbildungen 4-33 a – b sind die Retentionsfaktoren von Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly dargestellt, die unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen auf den Polymeren  $P_B(-)$ ,  $P_B(\text{Ala-Gly})$  und  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  erzielt wurden.

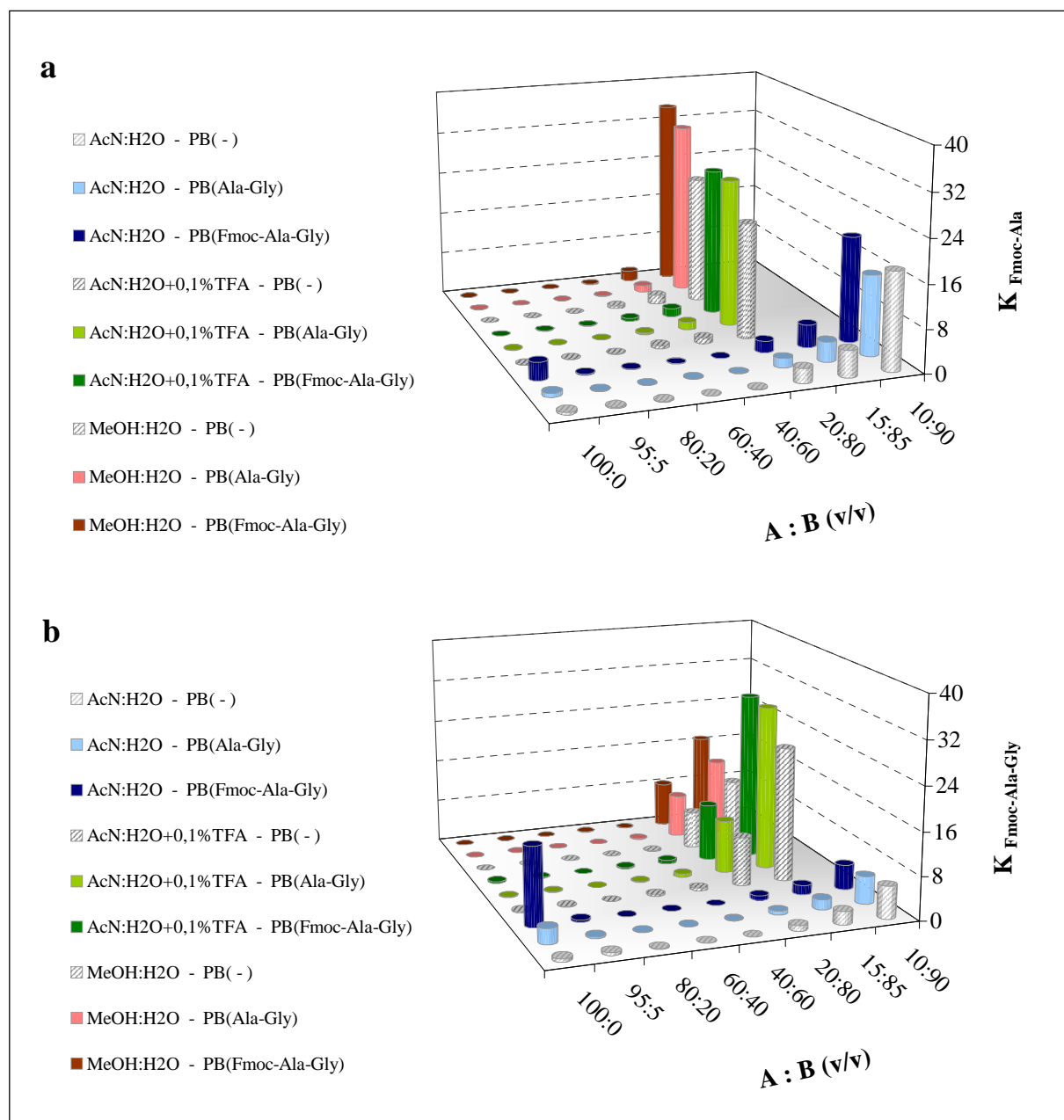


Abb. 4-33: Retentionsfaktoren (K) des Fmoc-Ala (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Fmoc-Ala-Gly (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O) auf den hierarchisch geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Auf allen Polymeren konnte eine zunehmende Retention von Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly mit ansteigendem Wasser-Gehalt in den Methanol/Wasser-Mischungen sowie Acetonitril/Wasser-Mischungen ab einem Wasser-Gehalt von 40% festgestellt werden. Beinhaltete die Acetonitril/Wasser-Mischung weniger als 80% Wasser bzw. die Methanol/Wasser-Mischung weniger als 60% Wasser, wurden die Zielanalyten kaum oder gar nicht reteniert. Dies drückte sich in Retentionsfaktoren, die Werte kleiner 1 zeigten, aus. Die Zugabe von 0,1% TFA zu den Acetonitril/Wasser-Mischungen bewirkte eine Verbesserung der Retention des Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly im wässrigen Milieu. Unter Verwendung von mobilen Phasen, die einen hohen Wasser-Anteil aufwiesen, wurden die Fmoc-geschützten Zielanalyten Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly auf der stationären Phase  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  im Vergleich zum  $P_B(\text{Ala-Gly})$  stärker reteniert. Dennoch war die Retention des Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly auf den verschiedenen Polymeren und somit auch auf dem NIP im wässrigen Milieu sehr ähnlich. Dies ist auf nicht selektive hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen. Fmoc-Ala-Gly retenierte in Acetonitril/Wasser- und Methanol/Wasser-Mischungen, die einen hohen Wasser-Anteil hatten, weniger als Fmoc-Ala. In Acetonitril/Wasser-Mischungen, denen 0,1% TFA zugesetzt wurde, war die Fmoc-Ala- und Fmoc-Ala-Gly-Retention gleich hoch.

Mit Acetonitril als mobile Phase konnte insbesondere auf den MIPs im Vergleich zu den NIP eine erhöhte Retention des Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly festgestellt werden (Tab. 4-50, Tab. 4-51 und Abb. 4-33 a – b).

Tab. 4-50: Retentionsfaktoren (K) des Fmoc-Ala (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren

Polymer mobile Phase (v/v)	$K_{\text{Fmoc-Ala}} - P_B(-)$		$K_{\text{Fmoc-Ala}} - P_B(\text{Ala-Gly})$		$K_{\text{Fmoc-Ala}} - P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$	
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA
100 : 0	0,44	0,02	0,77	0,02	3,29	0,01
95 : 5	0,19	0,05	0,08	0,01	0,19	0,04
90 : 10	0,10	-0,02	-0,07	-0,02	0,03	0,01

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-51: Retentionsfaktoren (K) des Fmoc-Ala-Gly (0,1 µmol/ml) auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren

Polymer	$K_{\text{Fmoc-Ala-Gly} - P_B(-)}$		$K_{\text{Fmoc-Ala-Gly} - P_B(\text{Ala-Gly})}$		$K_{\text{Fmoc-Ala-Gly} - P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})}$	
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA
<b>100 : 0</b>	0,59	0,15	2,87	0,11	14,53	0,36
<b>95 : 5</b>	0,51	0,09	0,30	0,04	0,43	0,18
<b>90 : 10</b>	0,21	-0,02	0,09	-0,08	-0,01	0,03

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die Zugabe von 5% Wasser oder 0,1% TFA zum Acetonitril bewirkte eine Verschlechterung der Retention auf allen Polymeren. Dies verdeutlicht, dass die Retention in der mobilen Phase Acetonitril überwiegend auf ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen basierte. Unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase wurde die größte Retention für die Fmoc-geschützte Aminosäure bzw. das Peptid auf der stationären Phase  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  auf Grund der sterischen Übereinstimmung von Prägungskavität und Zielanalyt erreicht. Das NIP retenierte dagegen die Zielanalyten nicht. Weiterhin wurde Fmoc-Ala-Gly mit einem maximalen Retentionsfaktor von 14,53 stärker reteniert als Fmoc-Ala, für das nur ein maximaler Retentionsfaktor von 3,29 erreicht wurde, wenn Acetonitril als mobile Phase diente.

#### 4.4.2.2. Prägungsfaktoren

##### 4.4.2.2.1. Prägungseffekt gegenüber Alanin und Ala-Gly

Die Abbildungen 4-34 a – b sowie die Tabelle 4-52 zeigen die Prägungsfaktoren (Abschnitt 3.2.4.1.) von Alanin und Ala-Gly auf den hierarchisch geprägten Polymeren unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen.

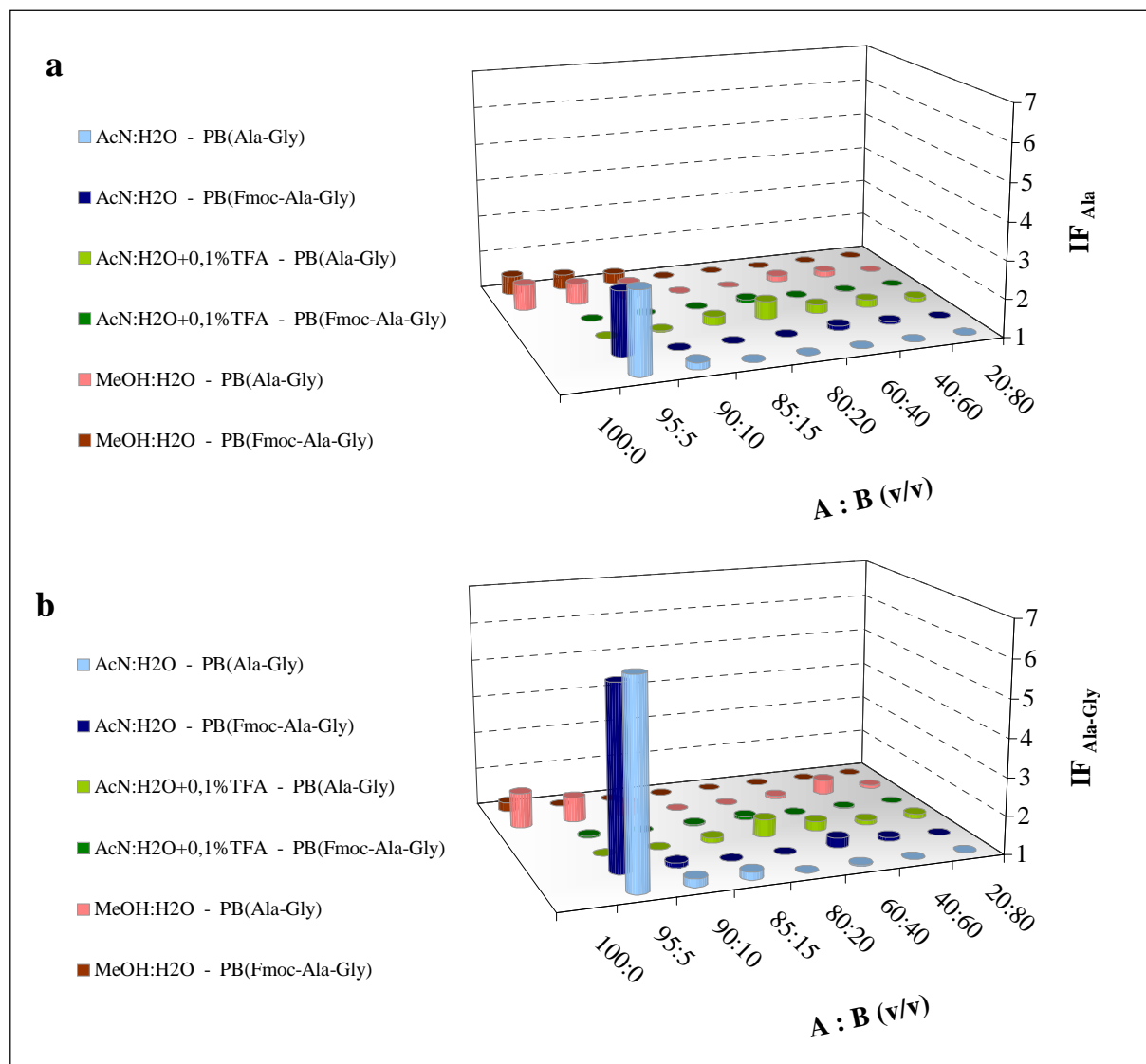


Abb. 4-34: Prägungsfaktoren (IF) des Alanins (10 µmol/ml) (a) und Ala-Gly (1 µmol/ml) (b) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B = H<sub>2</sub>O) auf den hierarchisch geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-52: Prägungsfaktoren (IF) des Alanins (10 µmol/ml) und Ala-Gly (1 µmol/ml) auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren

Polymer	IF <sub>Ala</sub> P <sub>B</sub> (Ala-Gly)		IF <sub>Ala</sub> P <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly)		IF <sub>Ala-Gly</sub> P <sub>B</sub> (Ala-Gly)		IF <sub>Ala-Gly</sub> P <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly)	
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA
mobile Phase (v/v)								
100 : 0	—	—	—	—	—	—	—	—
95 : 5	3,16	0,94	2,69	0,82	6,29	0,86	5,77	1,05
90 : 10	1,18	1,03	0,54	0,85	1,22	0,87	1,13	0,98

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Die höchsten Prägungsfaktoren wurden mit der Acetonitril/Wasser-Mischung (95:5; v/v) erzielt. Die Tabelle 4-52 verdeutlicht zusätzlich zu den Abbildungen 4-34 a – b, dass eine weitere Zugabe von Wasser oder 0,1% TFA zum Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) eine Verschlechterung des Prägungseffektes bewirkte. Folglich basierte die Retention des Alanins und Ala-Gly auf selektiven polaren Wechselwirkungen, wie ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen, mit den Prägungsstellen. Daher betrugen unter Verwendung von Acetonitril/Wasser- oder Methanol/Wasser-Mischungen, die 0,1% TFA enthielten, die Prägungsfaktoren weniger als 1,7. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass das Polymer P<sub>B</sub>(Fmoc-Ala-Gly) einen geringeren Prägungseffekt gegenüber der nicht Fmoc-geschützten Aminosäure bzw. des Peptids aufwies als das Polymer P<sub>B</sub>(Ala-Gly). Die selektive Bindung an die geprägten Kavitäten war bei dem größeren Zielanalyten Ala-Gly im Vergleich zu dem kleineren Zielanalyten Alanin stärker ausgeprägt.

##### 4.4.2.2.2. Prägungseffekt gegenüber Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly

Die Abbildungen 4-35 a – b sowie die Tabelle 4-53 zeigen die Prägungsfaktoren von Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly auf den hierarchisch geprägten Polymeren unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen. Unter Verwendung von Methanol oder Methanol/Wasser-Mischungen als mobile Phase waren die Prägungsfaktoren kleiner 1,5. Ebenso verhielt es sich in den Acetonitril/Wasser-Mischungen sowie den Acetonitril/Wasser-Mischungen, die 0,1% TFA enthielten. Somit basierte die Retention des Fmoc-Ala oder Fmoc-Ala-Gly im wässrigen Milieu auf nicht selektiven hydrophoben Wechselwirkungen. Die höchsten Prägungsfaktoren wurden unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase erzielt. Die Tabelle 4-53 verdeutlicht zusätzlich, dass die Zugabe von 5% Wasser oder 0,1% TFA zum Acetonitril eine Verschlechterung des Prägungseffektes bewirkte. Daher basierten die Wechselwirkungen zwischen Fmoc-Ala bzw. Fmoc-Ala-Gly und den MIPs in der mobilen Phase Acetonitril überwiegend auf selektiven ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen.



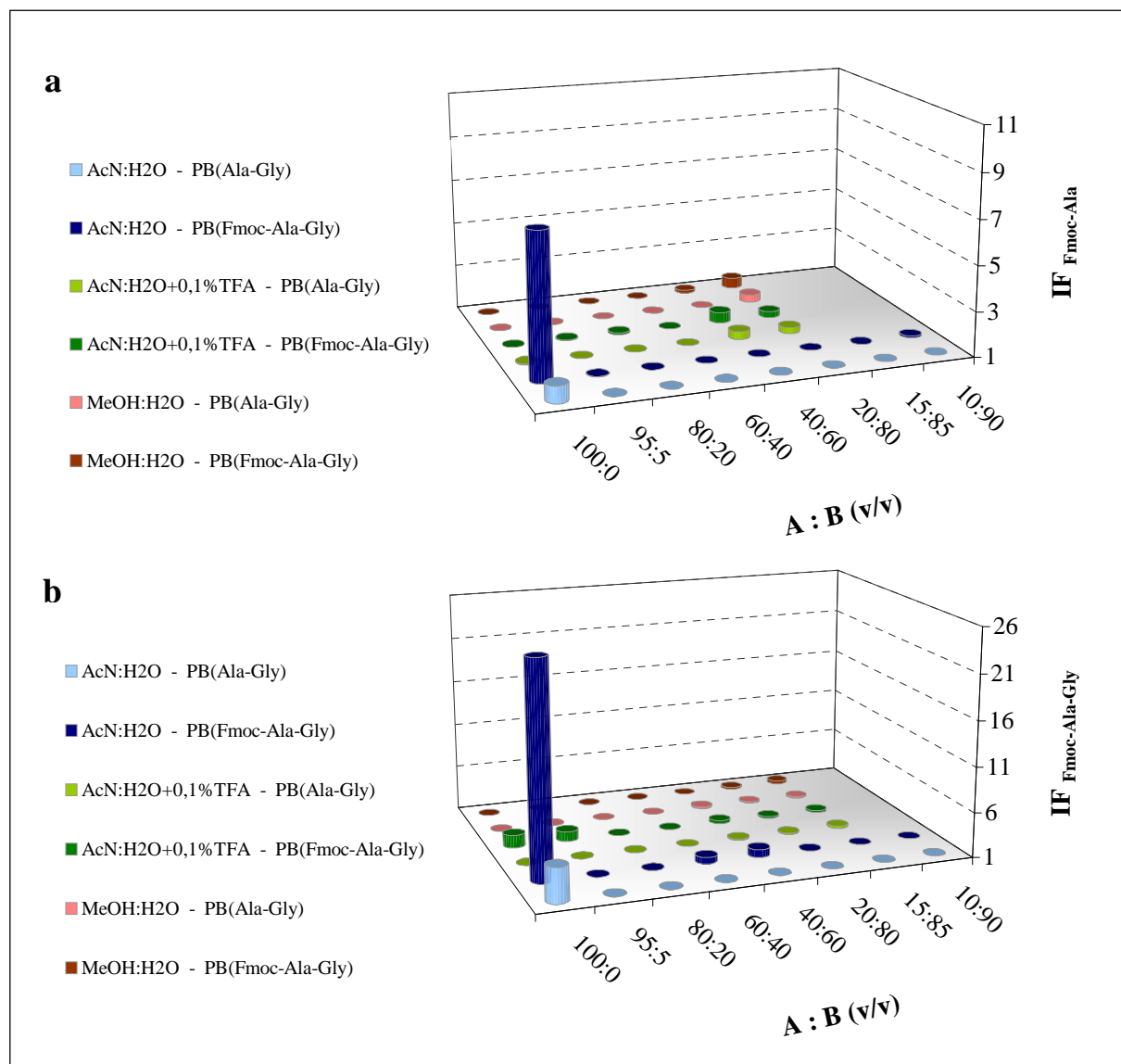


Abb. 4-35: Prägungsfaktoren (IF) des Fmoc-Ala (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (a) und Fmoc-Ala-Gly (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) (b) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen (A = AcN bzw. MeOH; B =  $\text{H}_2\text{O}$ ) auf den hierarchisch geprägten Polymeren; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Tab. 4-53: Prägungsfaktoren (IF) des Fmoc-Ala (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Fmoc-Ala-Gly (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf den verschiedenen hierarchisch geprägten Polymeren

Polymer	IF <sub>Fmoc-Ala</sub> P <sub>B</sub> (Ala-Gly)		IF <sub>Fmoc-Ala</sub> P <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly)		IF <sub>Fmoc-Ala-Gly</sub> P <sub>B</sub> (Ala-Gly)		IF <sub>Fmoc-Ala-Gly</sub> P <sub>B</sub> (Fmoc-Ala-Gly)	
mobile Phase (v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA
100 : 0	1,75	1,06	4,85	0,73	7,43	0,82	24,59	2,40
95 : 5	0,45	0,27	0,59	0,55	1,01	1,04	0,84	2,11
90 : 10	0,76	1,20	0,26	0,55	0,42	3,81	0,05	1,19

HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

#### 4.4.2.3. Separation der nicht Fmoc-geschützten und Fmoc-geschützten Aminosäuren und Peptide

In den Abbildungen 4-36 a – b ist die Separation der nicht Fmoc-geschützten und Fmoc-geschützten Aminosäuren und Peptide an ausgewählten Beispielen dargestellt.

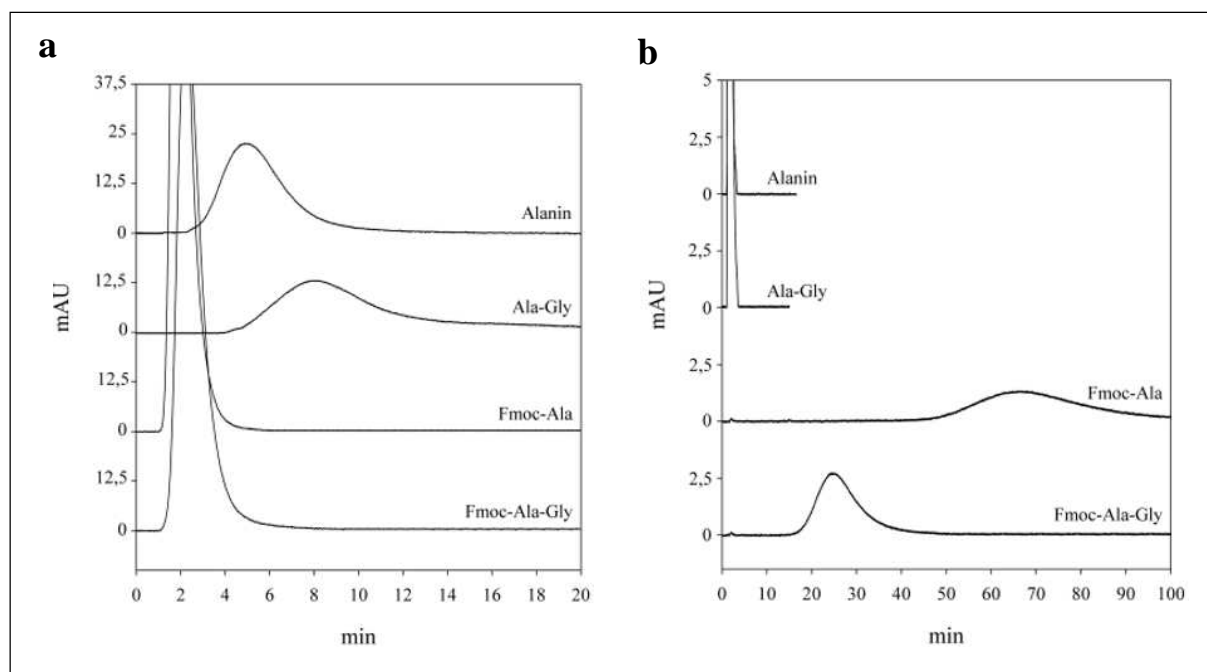


Abb. 4-36: Chromatogramme aus der Evaluierung des Polymers  $P_B(\text{Ala-Gly})$  unter Verwendung von Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) (a) oder Acetonitril/Wasser/TFA (19,8:79,2:1; v/v) (b) als mobile Phase; HPLC-Bedingungen zur chromatographischen Evaluierung siehe Abschnitt 3.2.4.1.

Es konnte keine Basislinientrennung zwischen Alanin und Ala-Gly erreicht werden, auch wenn als mobile Phase Acetonitril/Wasser (95:5; v/v) diente, in der die höchsten Retentions- und Prägunfaktoren erzielt wurden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Retention eines Analyten auf MIPs in breiten Peaks resultiert. Weiterhin konnte in den Acetonitril/Wasser-Mischungen mit einem geringen Wasser-Anteil keine Separation des Alanins und Ala-Gly vom Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly auf Grund breiter Peaks erreicht werden. In wässrigen mobilen Phasen konnte dagegen eine Basislinientrennung zwischen Alanin bzw. Ala-Gly, die unter diesen Bedingungen nicht reteniert, und Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly, die mit zunehmenden Wasser-Anteil stärker reteniert, erzielt werden.

Zwischen Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly konnte auf Grund der unterschiedlichen Retentionsstärke ebenfalls im wässrigen Milieu eine Basislinientrennung erzielt werden.

### 4.4.2.4. Zusammenfassende Betrachtung

Da im Gegensatz zu den MIPs das NIP die Zielanalyten Alanin, Ala-Gly, Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly in Acetonitril bzw. Acetonitril, das geringe Mengen Wasser enthielt, nicht retinierte, basierte in diesen mobilen Phasen deren Retention auf selektiven Wechselwirkungen innerhalb der molekular geprägten Kavitäten. Dass die Retention in apolaren Lösemitteln auf ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen basierte, wurde durch die Zugabe von Wasser bzw. wässriger TFA zum Acetonitril, was eine Abnahme der Retention bewirkte, bestätigt. Die räumliche Vergrößerung der Prägungskavität durch Mitprägen der Fmoc-Schutzgruppe, wie es beim Polymer  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  der Fall war, wirkte sich negativ auf die Retention des Alanins und Ala-Gly aus. Offenbar waren die Aminosäure und das Dipeptid in der größeren Prägungskavität aus sterischen Gründen nicht mehr in der Lage, optimale Wechselwirkungen einzugehen. Weiterhin wurde das Dipeptid Ala-Gly stärker retiniert als die Aminosäure Alanin. Diese Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen bezüglich der Retention von Lysin und Lys-Ala auf den mit C-terminalen Analoga von Nisin geprägten Polymeren, was unter Abschnitt 4.3.2. dargestellt ist.

Der größte Prägungseffekt gegenüber Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly wurde auf dem Polymer  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  unter Verwendung von Acetonitril als mobile Phase erzielt, wobei die Retention auf selektiven ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen basierte. Das Polymer  $P_B(\text{Ala-Gly})$  wies eine deutlich geringe Affinität sowie einen deutlich geringeren Prägungseffekt zu den Fmoc-geschützten Zielanalyten auf, da nicht der gesamte Zielanalyt als Templat diente. Die starke Retention von Fmoc-Ala und Fmoc-Ala-Gly im wässrigen Milieu ist vor allem auf zusätzliche nicht selektive hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen, da die Prägungsfaktoren nur Werte kleiner 1,5 aufwiesen. Die nicht Fmoc-geschützten Zielanalyten Alanin und Ala-Gly wurden im wässrigen Milieu von den Polymeren nicht retiniert. Dies verdeutlicht, dass für die hydrophoben Wechselwirkungen ausschließlich die Fmoc-Schutzgruppe verantwortlich war.

Im zusammenfassender Betrachtung des Abschnittes 4.3.2.4., welcher die Retention des Lysins und Lys-Ala darstellt, und diesen Abschnitts 4.4.2., welcher die Retention des Alanins und Ala-Gly beinhaltet, konnte festgestellt werden, dass die Retention der Aminosäuren und Peptide in apolaren Lösemitteln auf selektiven polaren Wechselwirkungen, wie ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen, basierte. Die Verwendung eines Templats, das größer war als die Zielanalyten, bewirkte eine Verschlechterung der Wiedererkennungseigenschaften. Eine Retention der Aminosäuren und Dipeptide in Lösemitteln mit hohem Wasser-Anteil war nicht möglich. Dies konnte jedoch durch Einbringung einer Fmoc-Schutzgruppe in den Zielanalyten erreicht werden, wonach allerdings die Retention auf nicht selektiven hydrophoben Wechselwirkungen basierte, da auch das NIP die Fmoc-Verbindungen retenierte. In der Literatur existieren mehrere Beispiele, die zeigen, dass eine Fmoc- oder Boc-Schutzgruppe bedeutenden Einfluss auf die Wiedererkennungseigenschaften hat (Kempe & Mosbach, 1995; Andersson et al., 1996; Kempe, 1996; Shim et al., 2004). Weiterhin hat die Einbringung einer Schutzgruppe in den Zielanalyten oder die Verwendung einer strukturähnlichen geschützten Aminosäure bzw. eines Peptids als Templat Bedeutung hinsichtlich der Problematik der Templatausblutungen.

## 4.5. Rasterelektronenmikroskopie

Mit der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung einiger Polymere (Abb. 4-37 bis 4-42) sollen die Unterschiede der einzelnen Polymere, die in den vorherigen Abschnitten 4.1. bis 4.4. anhand des Retentionsvermögens und der Wiedererkennungseigenschaften charakterisiert wurden, visualisiert werden.

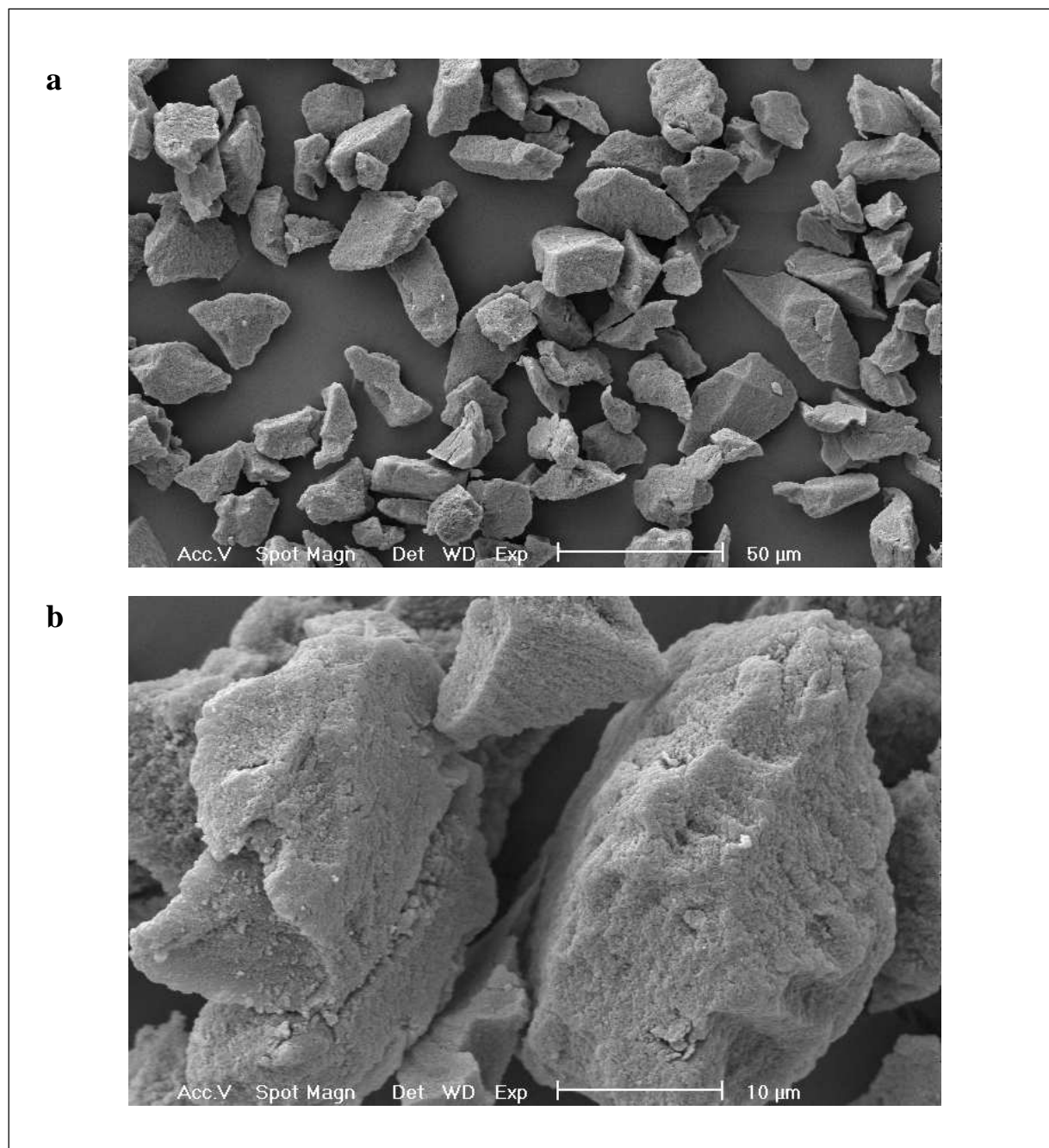


Abb. 4-37: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Bulk-Polymers P(CAP\_MAA);  
(Vergrößerung: a = 500fach, b = 2500fach)

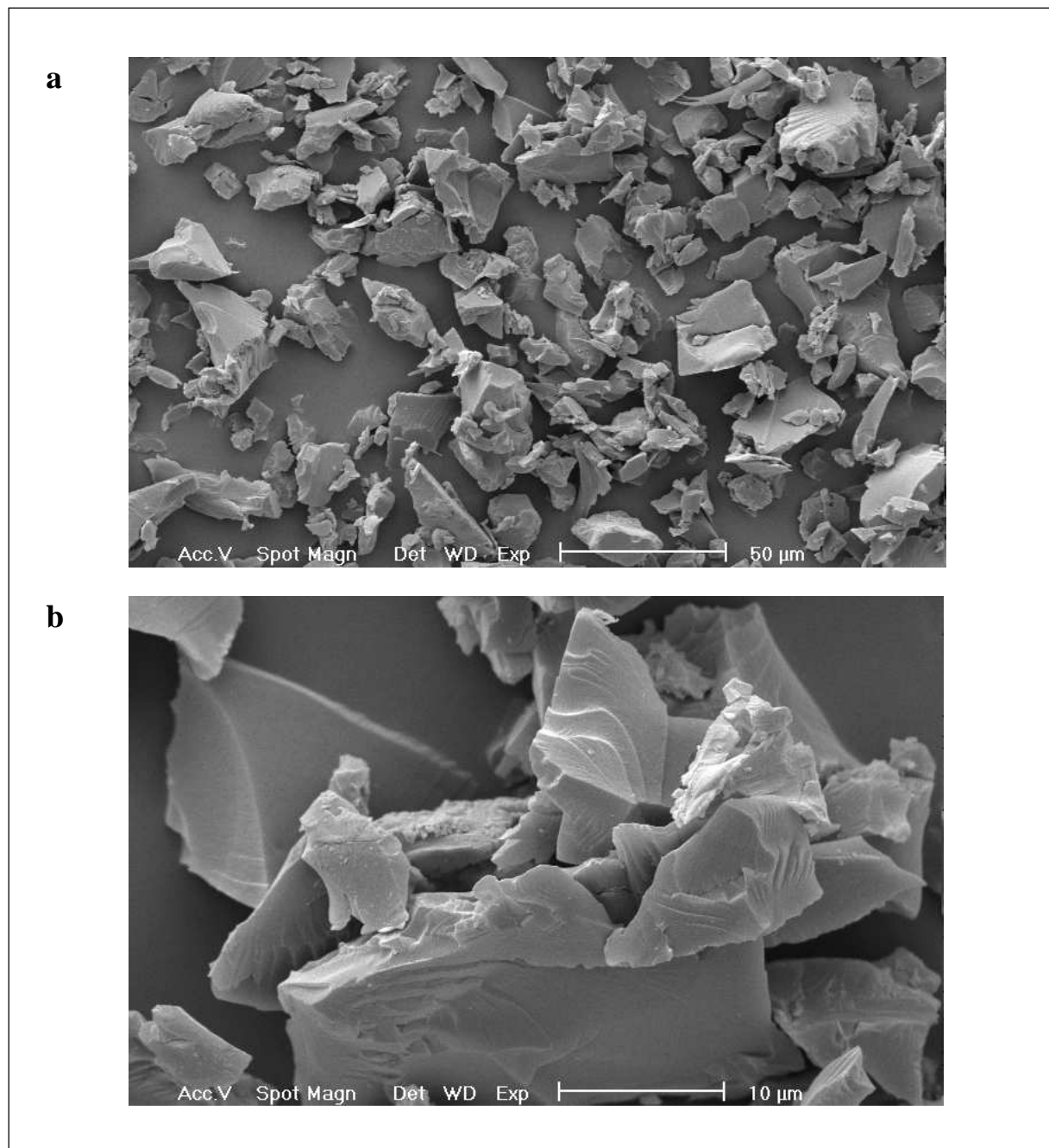


Abb. 4-38: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Bulk-Polymers P(TAP\_2VPy);  
(Vergrößerung: a = 500fach, b = 2500fach)

Die Partikel der Polymere P(CAP\_MAA) (Abb. 4-37) und P(TAP\_2VPy) (Abb. 4-38), die zur Separation von Chloramphenicol eingesetzt wurden, zeigen die für Bulk-Polymere typische unregelmäßige Form und Größe (Abschnitt 2.1.6.1.) (Sellergren & Shea, 1993; Kempe, 1996; Pérez-Moral & Mayes, 2004; Simon et al., 2005). Weiterhin ist aber auch ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen den mit verschiedenen funktionellen Monomeren synthetisierten Polymeren erkennbar. Dass mit MAA synthetisierte Polymer wies eine engere

Größenverteilung und regelmäßigere Form der Polymerpartikel auf, als das mit 2VPy synthetisierte Polymer. Darüber hinaus erscheint die Oberfläche des P(CAP\_MAA), im Vergleich zu den relativ glatten Bruchflächen des P(TAP\_2VPy), amorpher. Die morphologischen Unterschiede der Bulk-Polymere P(CAP\_MAA) und P(TAP\_2VPy) spiegeln die beobachteten verschiedenen Retentions- und Wiedererkennungseigenschaften gegenüber dem Zielanalyten Chloramphenicol wieder (Abschnitt 4.1. und 4.2.).

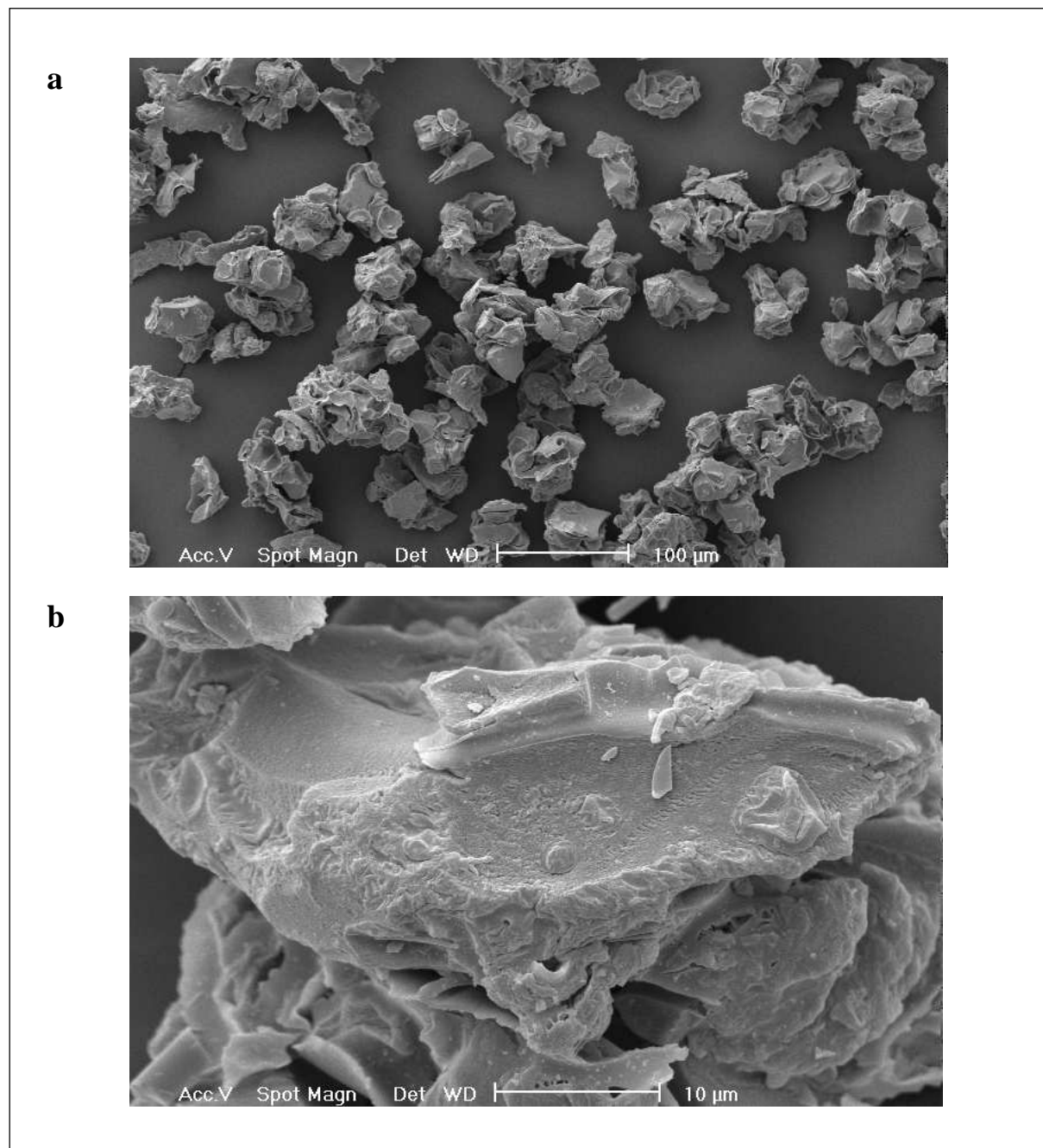


Abb. 4-39: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des hierarchisch geprägten Polymers P(Lys-Ala-Val); (Vergrößerung: a = 200fach, b = 2500fach)

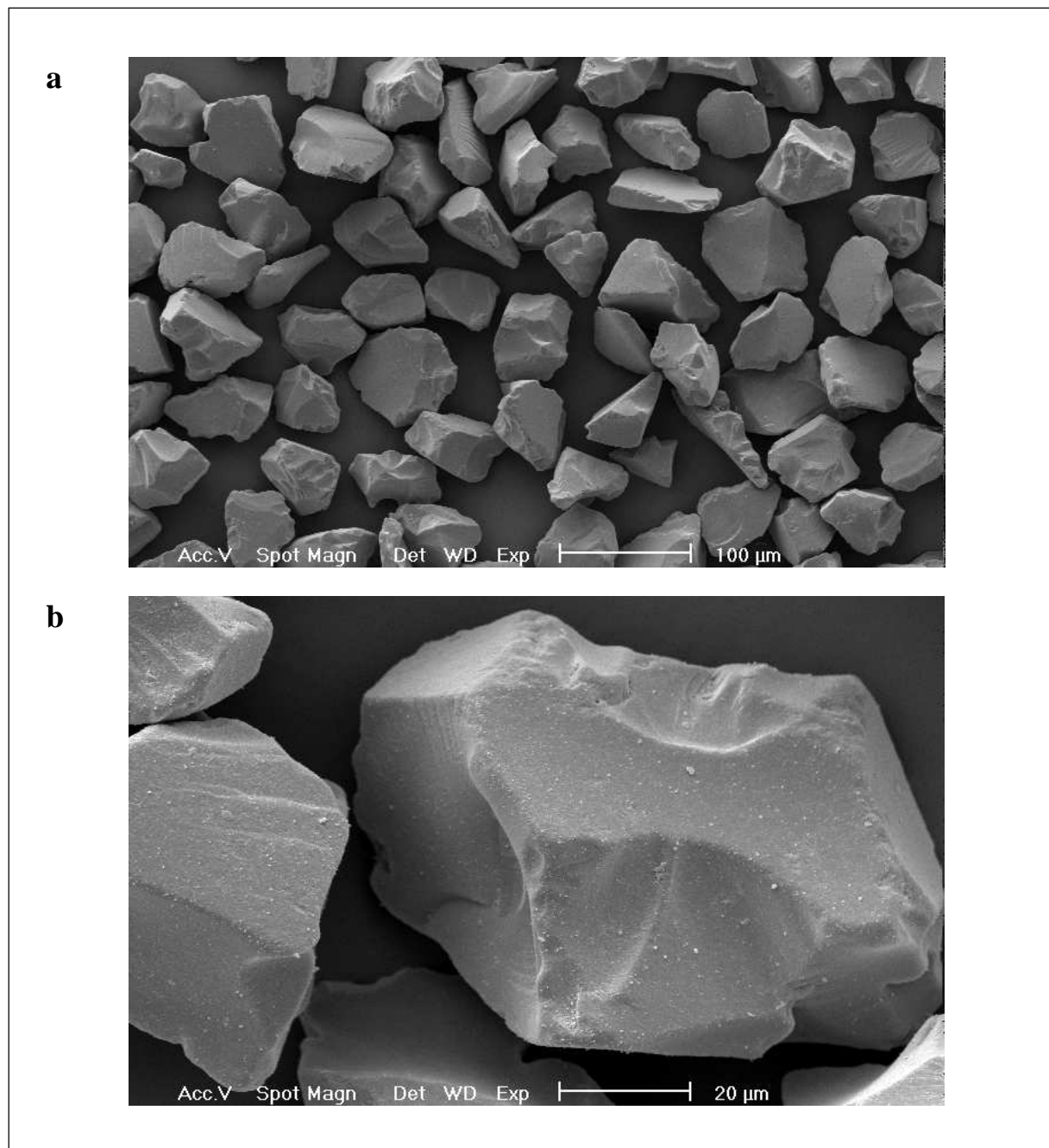


Abb. 4-40: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des zur hierarchischen Prägung verwendeten Ausgangsmaterials Silicagel A; (Vergrößerung: a = 200fach, b = 1000fach)

Die Morphologie des zur Separation von Nisin (Abschnitt 4.3.) verwendeten hierarchisch geprägten Polymers P(Lys-Ala-Val) (Abb. 4-39) ist vom Silicagel A (Abb. 4-40), welches das vorgeformte Material darstellt, eindeutig zu unterscheiden. Das Silicagel A ist von unregelmäßiger Form mit glatten Bruchstellen und einer engen Größenverteilung. Dagegen ist die Form der geringfügig kleineren Polymerpartikel wesentlich unregelmäßiger. Die



Größenverteilung der Polymerpartikel und der Silicagelpartikel ist vergleichbar (Yilmaz et al., 2002; Titirici & Sellergren, 2004). Weiterhin sind keine Aggregate der Polymerpartikel zu erkennen. Diese können durch Präpolymer, das sich außerhalb der Silicagelporen befindet, während der Polymerisation verursacht werden.

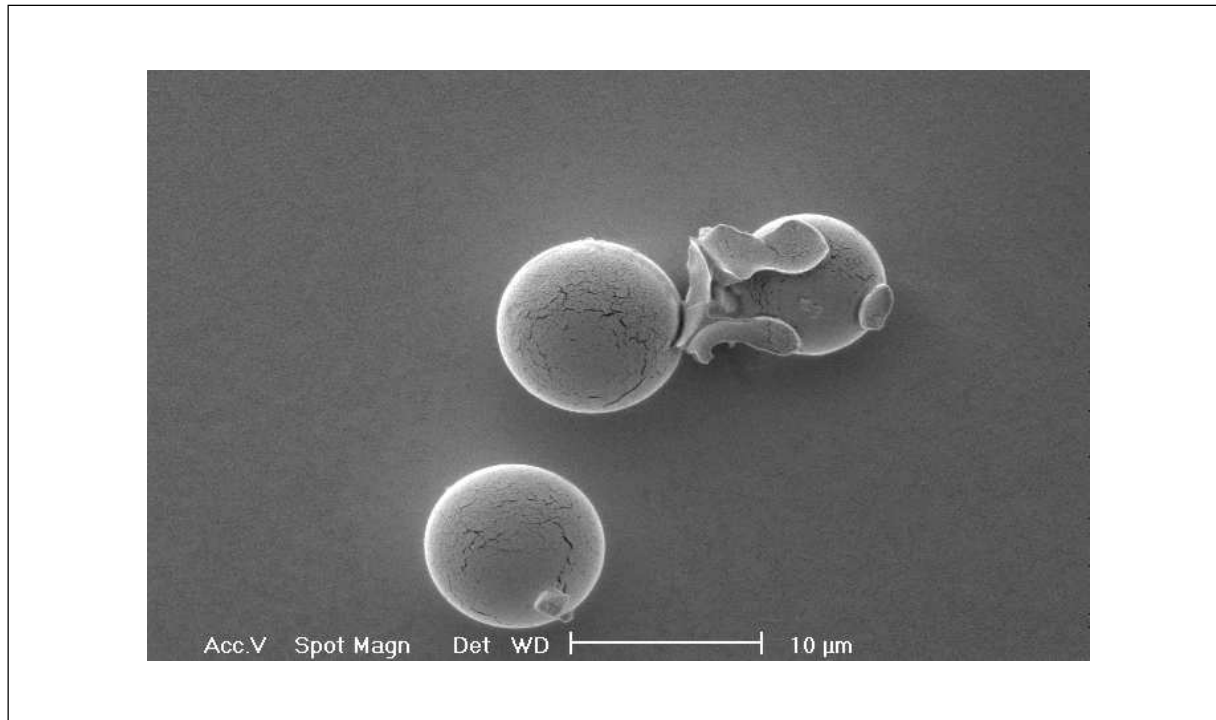


Abb. 4-41: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des hierarchisch geprägten Polymers P(Ala-Gly); (Vergrößerung = 2500fach)

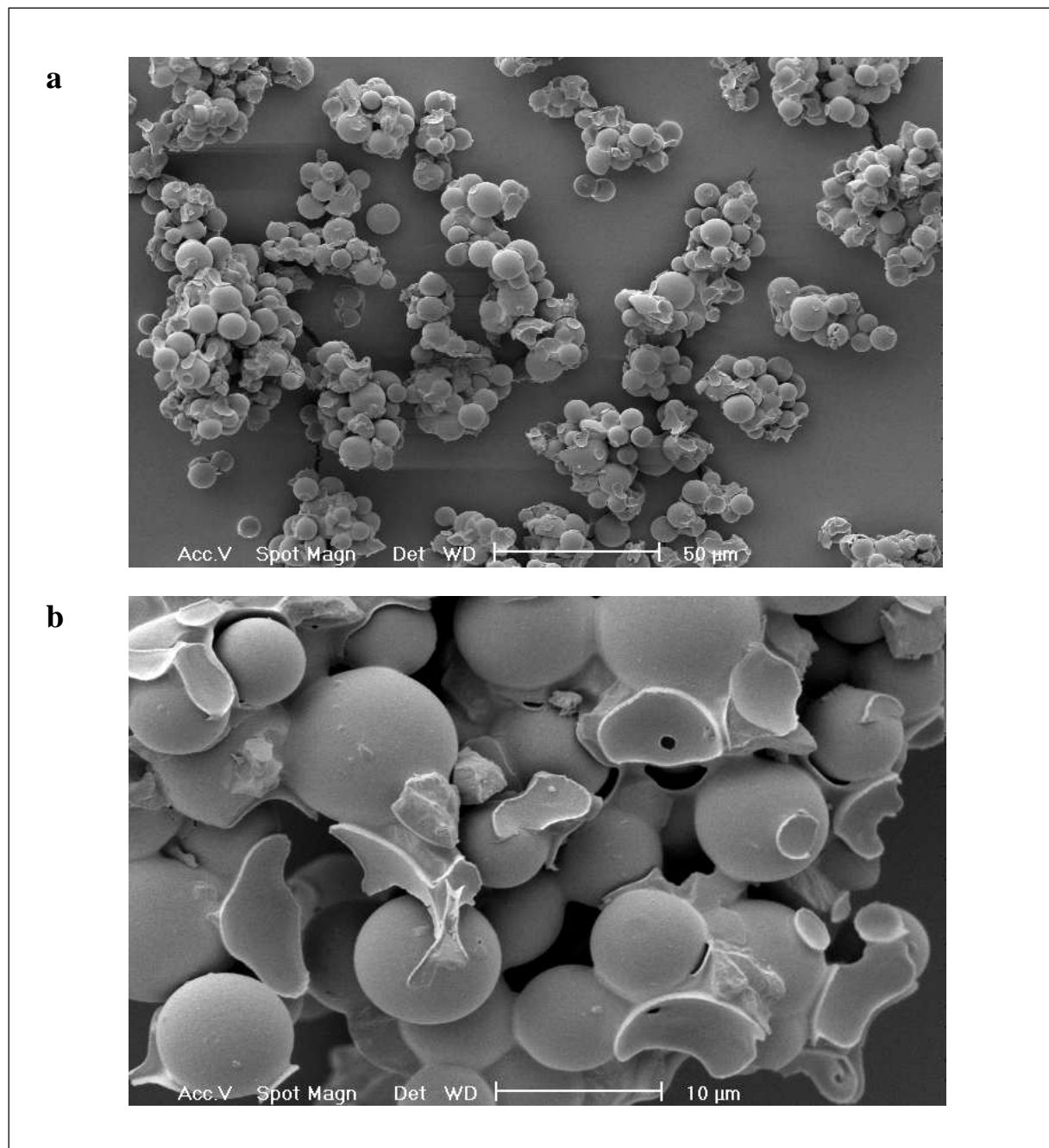


Abb. 4-42: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Aggregaten des hierarchisch geprägten Polymers P(Ala-Gly); (Vergrößerung: a = 500fach, b = 2500fach)

Bei der Synthese des hierarchisch geprägten Polymers P(Ala-Gly), das zur Bestimmung von Ala-Gly verwendet wurde (Abschnitt 4.4.), diente als Ausgangsmaterial ein Silicagel mit sphärischen Partikeln. Folglich wiesen auch die resultierenden Polymerpartikel eine sphärische Form auf (Yilmaz et al., 2002; Titirici & Sellergren, 2004). Die Abbildung 4-41 zeigt Polymerpartikel, die keine bzw. kaum Aggregate gebildet haben. Dagegen sind in der Abbildung 4-42 Polymerpartikel dargestellt, die auf Grund von Präpolymer, das außerhalb der

Silicagelporen polymerisiert ist, sich zu größeren Aggregaten vereint haben. Die Ausbildung von Aggregaten ist unerwünscht, da diese eine unregelmäßige Form sowie eine breitere Größenverteilung der Partikel bedingt. Außerdem führt die Aggregatbildung zu einem Kontrollverlust über die Form und Größenverteilung der Partikel.

Obwohl zur Synthese des hierarchisch geprägten Polymers P(Lys-Ala-Val) sowie des Bulk-Polymers P(CAP\_MAA) MAA und EDMA als Monomere dienten, zeigen die Partikeloberflächen morphologische Unterschiede. Die weniger amorphe Oberflächenstruktur des P(Lys-Ala-Val) ist darauf zurückzuführen, dass das Präpolymer kein Porogen, das die Porosität eines Polymers bedingt (Cormack & Elorza, 2004; Spivak, 2005), enthielt. Weiterhin kann durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verdeutlicht werden, dass durch die Polymerisation in vorgeformten Partikeln, wie es bei der hierarchischen Prägung der Fall ist, die Größenverteilung und Form der resultierenden Polymerpartikel wesentlich besser kontrolliert und beeinflusst werden kann als mit der herkömmlichen Bulk-Polymerisation (Yilmaz et al., 2002).

## 5. Schlussbetrachtung und Ausblick

In der Abbildung 5-1 ist die Vorgehensweise dieser Arbeit zur Entwicklung eines MIPs mit definierter Selektivität und dessen Anwendung für lebensmittelanalytische Fragestellungen schematisch dargestellt.

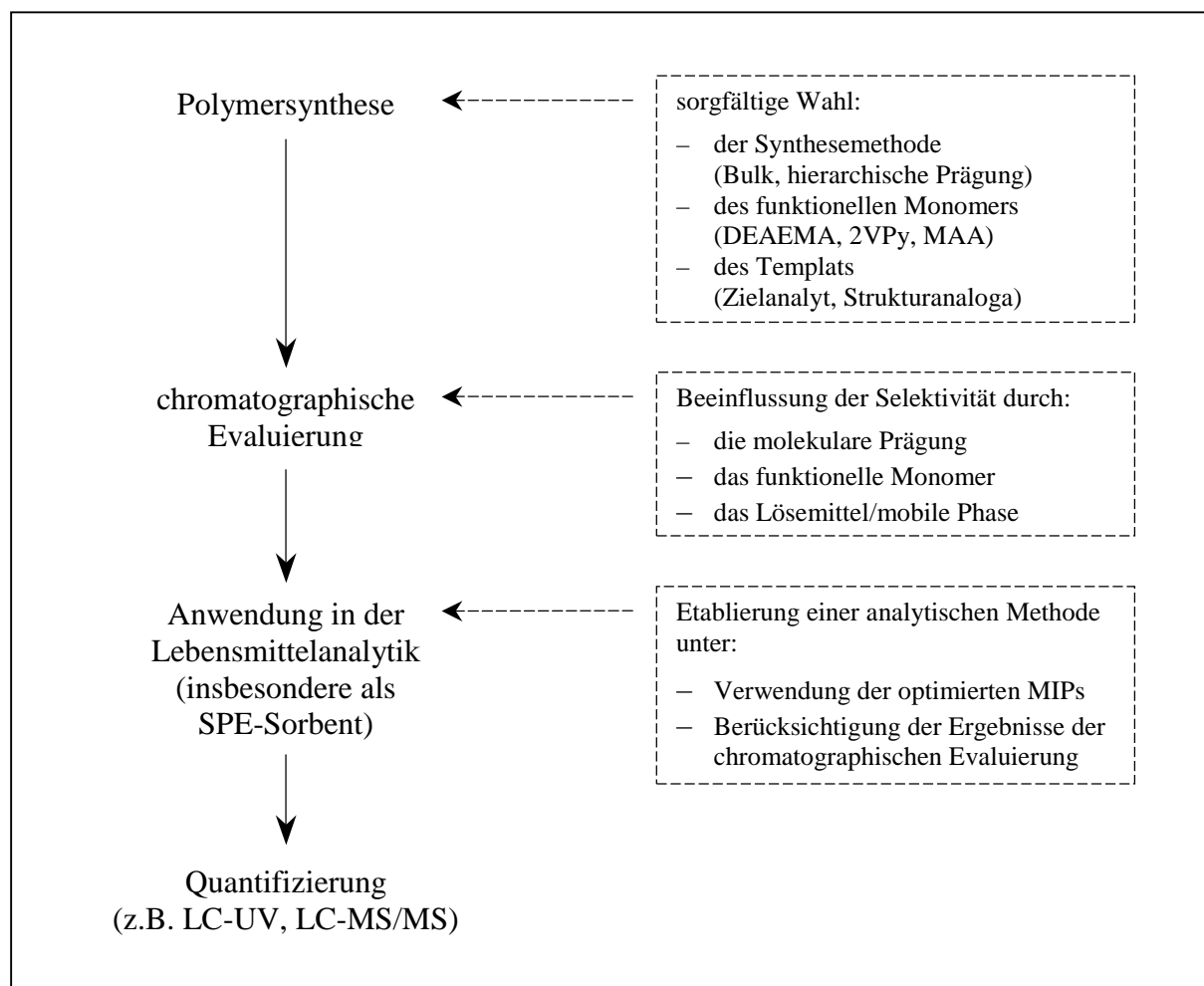


Abb. 5-1: Vorgehensweise zur Entwicklung eines MIPs und dessen Anwendung in der Lebensmittelanalytik

Die chromatographische Evaluierung synthetisierter MIPs liefert wertvolle Informationen für die praktische Anwendung der MIPs, wie beispielsweise als Sorbent in einer Festphasenextraktion, welche die Abtrennung von Komponenten aus der Lebensmittelmatrix und die Anreicherung des Analytens zum Ziel hat. Für den lebensmittelanalytischen Einsatz der MIPs ist vor allem die automatisierte Kopplung an ein Trennsystem mit der matrixsensitiven massenspektroskopischen Detektion von großem Interesse.

Es konnte ein Polymer (P(CAP\_2VPy)) synthetisiert werden, mit dem es erstmalig möglich war, Chloramphenicol in apolaren aber auch in wässrigen Lösemittelmischungen zu separieren. Die in dieser Arbeit zur MIP-Evaluierung angewendete Chloramphenicol-Detektion basierend auf UV-Absorption, bei der eine Bestimmungsgrenze von 1,1 nmol/ml (350 µg/l) erreicht wurde, erfüllt nicht die gesetzlich geforderte Mindestleistungsgrenze von 0,3 µg/kg (Richtlinie 96/23/EG). Deshalb ist für die künftige Etablierung einer Routinemethode geplant, das MIP als Sorbent in einer online-Festphasenextraktion, die mit einer LC-MS/MS gekoppelt ist, einzusetzen. Die mit der online-MIPSPE-LC-MS/MS bisher durchgeführten Untersuchungen ergaben vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Bestimmung von Chloramphenicol in Honig und Propolis, die sehr komplexe Matrices darstellen. In der Literatur existieren bisher keine auf MIP basierenden Methoden zur Quantifizierung von Chloramphenicol, welche die Mindestleistungsgrenze erfüllen und für komplexe Matrices wie Honig oder Propolis geeignet sind. Für die Quantifizierung des Chloramphenicols mittels online-MIPSPE-LC-MS/MS ist jedoch eine weitere Optimierung des MIPs notwendig, da bei der geforderten niedrigen Nachweisgrenze die noch bestehende Problematik der Templatausblutung zu einer Überschätzung der Ergebnisse führte. Deshalb wurden Polymere synthetisiert, die mit den zum Chloramphenicol strukturähnlichen Molekülen Florfenicol und Thiamphenicol geprägt waren, so dass Templatausblutungen die Quantifizierung nicht stören können, da es sich beim Templat nicht um das Zielmolekül Chloramphenicol handelt. Zudem wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein MIP zur Separation von Chloramphenicol eingesetzt, das mit einem Strukturanalogen geprägt war. Das mit Florfenicol geprägte Polymer wies unter wässrigen Bedingungen ein höheres Retentionsvermögen gegenüber Chloramphenicol auf als die mit Chloramphenicol geprägten Polymere. Weiterhin sind zur Chloramphenicol-Separation aus Honig- oder Propolisproben die selektiven Wasserstoffbrückenbindungen, die in apolaren Lösemitteln überwiegen, von Interesse. Allerdings wiesen die Florfenicol und Thiamphenicol geprägten Polymere im Vergleich zum Chloramphenicol geprägten Polymer in apolaren Lösemitteln ein geringeres Retentionsvermögen und einen geringeren Prägungseffekt gegenüber Chloramphenicol auf. Derzeit steht kein geeignetes Strukturanalogue zur Verfügung, mit dem Prägungskavitäten erhalten werden, die in apolaren Lösemitteln im notwendigen Ausmaß selektive Wasserstoffbrückenbindungen mit Chloramphenicol ausbilden können.

Weiterhin konnte erstmals ein Polymer synthetisiert werden, das als Sorbent in der Festphasenextraktion von Nisin von Interesse ist. Da es sich beim Nisin um ein

Makromolekül handelt, das auf Grund seiner Größe nicht durch die Matrix eines üblichen Bulk-Polymers diffundieren und somit die Bindungsstellen nicht erreichen kann, wurde die Methode der hierarchischen Prägung angewendet. Somit waren die Prägungskavitäten auf der gut zugänglichen Oberfläche der resultierenden Polymerpartikel lokalisiert. Zur hierarchischen Prägung wurde die Epitop-Strategie eingesetzt, wobei eine zur Nisin C-terminalen Sequenz analoge Aminosäuresequenz geprägt wurde. Folglich konnte die Nisin-Bestimmung nicht durch eventuelle Templatausblutungen gestört werden. Rachkov und Minoura (2000; 2001) sowie Rachkov et al. (2004) verwendeten zur Wiedererkennung von Oxytocin und [Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup>]Angiotensin II ebenfalls Polymere, die gemäß der Epitop-Strategie mit der N-terminalen Sequenz der Zielseptide geprägt waren. Allerdings handelte es sich hier um Bulk-Polymere, durch deren hochvernetztes Matrix die Oligopeptide nicht diffundieren bzw. nur in die Meso- und Makroporen (siehe Abschnitt 2.1.4.1.) eintreten konnten. Der überwiegende Teil der Prägungskavitäten ist jedoch in den Mikroporen lokalisiert, da diese auch den größten Anteil an der Oberfläche bilden. Nisin ist als Konservierungsmittel in verschiedenen Milchprodukten wie Schmelzkäse oder gereiftem Käse zugelassen. Da diese Matrices wasserlöslich sind, ist die Anwendung des Polymers unter wässrigen Bedingungen von Interesse. Der Einsatz von MIPS in polaren Lösemitteln ist jedoch grundsätzlich problematisch, da die Synthese und somit Ausbildung der Templat/Monomer-Komplexe auf Grund der Monomere, die überwiegend hydrophob sind und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen sollen, in apolaren Lösemitteln erfolgen muss. Das Retentionsvermögen des Polymers P(Lys-Ala-Val) gegenüber Nisin unter wässrigen Elutionsbedingungen war für die Anwendung als Sorbent in einer Festphasenextraktion nicht ausreichend. Zur Etablierung einer lebensmittelanalytischen Bestimmungsmethode ist eine weitere Optimierung des Polymers zur Steigerung der Selektivität und daraus folgend des Retentionsvermögens notwendig. Die Erhöhung der Wiedererkennungseigenschaften könnte beispielsweise durch Zugabe eines Porogens zum Präpolymer und der damit verbundenen Erhöhung der Polymerporosität oder durch Verwendung des Quervernetzlers TRIM zur Polymersynthese, mit dem in der Literatur ebenfalls gute Prägungseffekte gegenüber Peptiden erzielt wurden (Kempe, 1996), erreicht werden. Ungeachtet davon besteht aber das Problem der eingeschränkten Stabilität des Nisins in Lösung oder bei erhöhten Temperaturen. Dies kann durch eine weniger invasive Probenvorbereitung minimiert werden, weshalb zum Beispiel eine online-Festphasenextraktion, die mit einem Trennsystem gekoppelt ist, anstelle der manuellen Festphasenextraktion verwendet werden sollte. Zudem erfordern die gemäß Zusatzstoff-Zulassungsverordnung Anlage 5 Teil C (Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998 Teil I

Nr. 8) zulässigen Maximalgehalte des Nisins in den jeweiligen Endprodukten zwischen 3 mg/kg und 12,5 mg/kg den Einsatz der LC-MS/MS.

Es konnte gezeigt werden, dass MIPs grundsätzlich zur hochselektiven Separation von Peptiden geeignet sind, da in apolaren Lösemitteln die mit Ala-Gly hierarchisch geprägten Polymere eindeutig eine hohe Affinität gegenüber Ala-Gly, das Bestandteil von mehreren bioaktiven Oligopeptiden ist, aufwiesen. Durch Einbringung einer Fmoc-Gruppe in das Peptid konnte dieses auch unter wässrigen Bedingungen separiert werden, wobei darüber hinaus die Problematik der Templatausblutungen umgangen wurde. Die Separation sowie Anreicherung von bioaktiven Peptiden ist zur Isolierung und Charakterisierung von bioaktiven Sequenzen sowie zur Produktkontrolle von funktionellen Lebensmitteln mit bioaktiven Peptiden von Interesse, die zur Minimierung von Krankheitsrisiken oder zur Verbesserung bestimmter physiologischer Funktionen beitragen können. Für künftige Arbeiten ist die selektive Analytik von Proteinen bzw. Peptid-Epitopen mit allergenen Eigenschaften geplant. Aus Gründen der Produkthaftung gehen verschiedene Hersteller teilweise dazu über, ihre Produkte pauschal mit der Angabe zu versehen, dass Spuren bestimmter kennzeichnungspflichtiger Allergene enthalten sein können. Diese Vorgehensweise beruht darauf, dass Analyseverfahren zur allergenselektiven Quantifizierung geringer Mengen an Protein-Allergenen nicht zur Verfügung stehen. Eine genauere Deklaration der Lebensmittel würde die Wahlmöglichkeit betroffener Personen weniger einschränken, was zu einer deutlichen Erhöhung der Lebensqualität führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MIPs mit hoher selektiver Affinität gegenüber dem jeweiligen Zielanalyten synthetisiert, wobei die Wechselwirkungen überwiegend auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen und/oder selektiven ionischen Wechselwirkungen beruhten. Darüber hinaus besteht die grundsätzliche Einsatzmöglichkeit von nicht selektiven NIPs, insbesondere bei multidimensionalen automatisierten Festphasenextraktionen zur Abtrennung störender Matrixbestandteile (Boos & Fleischer, 2001) vor einer MS-Detektion.

## 6. Zusammenfassung

Zur Entwicklung leistungsfähiger Methoden, die zur Probenaufbereitung und Analytenaufkonzentrierung bei lebensmittelwissenschaftlichen Fragestellungen geeignet sind, wurden molekular geprägte Polymere (MIP) synthetisiert und evaluiert. Die Synthese der MIPs, die eine Analyt-selektive Affinität haben, erfolgte durch Copolymerisation eines funktionellen Monomers mit einem Quervernetzer in Anwesenheit eines Templats, das dem Zielanalyten entsprach bzw. eine analoge Molekülstruktur zum Zielanalyten aufwies. Nach der Polymerisation wurde das Template entfernt, so dass in dem dreidimensionalen porösen Polymernetzwerk Kavitäten zurückblieben, die in ihrer Größe, Form und sterischen Ausrichtung der funktionellen Gruppen komplementär zum Template waren. Diese Bindungsstellen waren für die selektive Wiederbindung des Zielanalyten verantwortlich.

Zur Bestimmung des Antibiotikums Chloramphenicol wurden verschiedene MIPs mittels Bulk-Polymerisation hergestellt. Die Verwendung von Chloramphenicol ist auf Grund gesundheitlicher Nebenwirkungen bei Lebensmittel liefernden Tieren innerhalb der Europäischen Union verboten. Zur Synthese wurden die funktionellen Monomere 2VPy, DEAEMA oder MAA verwendet. Als Template dienten Chloramphenicol sowie die Strukturanaloga Florfenicol und Thiamphenicol. Die Ergebnisse der chromatographischen Evaluierung der Polymere führen zu der Schlussfolgerung, dass die Retention des Chloramphenicols in apolaren Lösemitteln bezogen auf den Zielanalyten auf selektiven Wasserstoffbrückenbindungen beruhte. Die starke Retention des Chloramphenicols im wässrigen Milieu war auf nicht selektive hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen, da unter diesen Bedingungen auch die nicht molekular geprägten Polymere (NIP) Chloramphenicol retenierten. Dennoch ist die molekulare Prägung auch in Lösemitteln mit hohem Wasseranteil von Bedeutung, weil die MIPs eine bessere Separation des Chloramphenicols, bezogen auf die strukturähnlichen Moleküle Florfenicol und Thiamphenicol, als die entsprechenden NIPs aufwiesen. Das zur Polymersynthese verwendete funktionelle Monomer hatte einen großen Einfluss auf die Wiedererkennungseigenschaften. Die mit 2VPy synthetisierten Polymere zeigten in apolaren Lösemitteln ein deutlich höheres Retentionsvermögen sowie einen höheren Prägungseffekt gegenüber Chloramphenicol als die mit DEAEMA oder MAA synthetisierten Polymere. Im Anschluss an die chromatographische Evaluierung wurden die Polymere als Sorbent in einer manuellen Festphasenextraktion mit



dem Ziel der Abtrennung von Matrix und Aufkonzentrierung des Zielanalyten eingesetzt. Diente ein mit 2VPy synthetisiertes MIP als Sorbent, konnte aus einer Chloramphenicol-Lösung eine Wiederfindung von annähernd 100% erreicht werden, wenn Ethylacetat als Waschlösung verwendet wurde. Lösemittelmischungen mit einem hohen Wasseranteil als Waschlösung ergaben auf allen Polymeren eine Wiederfindung von annähernd 100%. Die Chloramphenicol-Wiederfindungen aus mit Chloramphenicol versetzten Honigproben betrugen über 90%. Honig stellt eine schwierige Matrix dar, so dass analytische Probleme zur Kontrolle der gesetzlich vorgeschriebenen Höchstwerte bestehen. Die im Vergleich zu wässrigen Waschlösungen bessere Abtrennung der Honigmatrix vom Chloramphenicol unter Verwendung von Ethylacetat weist auf die selektiven Wechselwirkungen des Chloramphenicols mit dem MIP unter apolaren Bedingungen hin. Darüber hinaus zeigten Versuche, bei denen das MIP als Sorbent in einer online-Festphasenextraktion, die mit einer LC-MS/MS gekoppelt war, eingesetzt wurde, dass auf Grund hochselektiver Bindung des Zielanalyten eine bessere Abtrennung der Matrix als mit herkömmlichen RP18-Materialien erreicht werden kann. Somit sind die auf die jeweilige Anwendung optimierten MIPs als Festphasenextraktionssorbent zur Abtrennung der Matrix und Aufkonzentrierung des Zielanalyten Chloramphenicols geeignet.

Bioaktive Oligopeptide, wie beispielsweise Nisin, können auf Grund ihrer Größe nicht durch die hochvernetzte Matrix eines Bulk-Polymers diffundieren und daher nicht die Bindungsstellen erreichen. Deshalb wurde zur Synthese der Polymere mit Affinität gegenüber Nisin bzw. dem bioaktiven Peptid Ala-Gly die Methode der hierarchischen Prägung angewendet, so dass die Bindungsstellen auf der Oberfläche der resultierenden Polymerpartikel lokalisiert waren. Zur Synthese Nisin-selektiver MIPs wurden entsprechend der Epitop-Strategie Aminosäuresequenzen verwendet, die eine zum C-Terminus von Nisin analoge Struktur aufwiesen. Die chromatographische Evaluierung ergab, dass das größte Retentionsvermögen gegenüber Nisin auf den C-terminal analog geprägten Polymeren mit Acetonitril/Wasser-Mischungen, die mehr als 80% Wasser enthielten, erreicht werden konnten. Da das NIP Nisin nicht retinierte, basierte die starke Retention des kationischen Peptids unter wässrigen Elutionsbedingungen auf selektiven ionischen sowie hydrophoben Wechselwirkungen. Des Weiteren wurde Nisin von den Polymeren, die mit einer längeren Aminosäuresequenz geprägt waren, stärker retiniert, da bei diesen offensichtlich eine bessere sterische Zugänglichkeit des C-Terminus vom Nisin in den Bindungskavitäten bestand. Bei der anschließenden manuellen Festphasenextraktion wurden unter Verwendung von

Acetonitril oder Acetonitril, das weniger als 10% Wasser enthielt, als Waschlösung Nisin-Wiederfindungen bis maximal 69% erhalten. Die verminderte Wiederfindung konnte auf die Instabilität des Nisins zurückgeführt werden. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist das mit der Nisin C-terminal analogen Sequenz Lys-Ala-Val geprägte Polymer zur Festphasenextraktion von Nisin anwendbar.

Die chromatographische Evaluierung der Polymere mit Affinität zum Alanin und Ala-Gly, das Bestandteil von mehreren bioaktiven Oligopeptiden, wie ACE-Inhibitoren und zytomodulierenden Peptiden ist, zeigte, dass deren Retention in apolaren Lösemitteln auf selektiven ionischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen basierte. Die Retention in Lösemitteln mit höherem Wassergehalt war erst durch Einbringung einer Fmoc-Schutzgruppe in die Zielanalyten auf Grund nicht selektiver hydrophober Wechselwirkungen möglich. Die Vergrößerung der Prägungskavität durch das Mitprägen der Fmoc-Schutzgruppe führte nicht zu einer höheren Retention des Alanins und Ala-Gly, da die Aminosäure und das Dipeptid aus sterischen Gründen nicht in der Lage waren optimale Wechselwirkungen mit der Kavität einzugehen. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse der mit Ala-Gly geprägten Polymere verdeutlichen, dass solche MIPs zur Separation von bioaktiven Peptiden geeignet sind.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten morphologische Unterschiede der einzelnen Polymere, welche die Ausbildung poröser Strukturen infolge der MIP-Synthese verdeutlichen und die beobachteten verschiedenen Retentions- und Wiedererkennungseigenschaften gegenüber den Zielanalyten widerspiegeln.

In dieser Arbeit wurden erstmals MIPs, die mit Chloramphenicol oder zum Chloramphenicol strukturähnlichen Molekülen geprägt waren, als Sorbent bei der Festphasenextraktion von Honigproben vor der Quantifizierung mittels RP18-HPLC bzw. in Kombination mit LC-MS/MS eingesetzt. Weiterhin wurden erstmals MIPs synthetisiert, die Affinität gegenüber dem Oligopeptid Nisin bzw. dem bioaktiven Peptidfragment Ala-Gly aufwiesen. Somit bilden die Ergebnisse dieser Arbeit eine Grundlage für künftige Anwendungen von MIPs als selektive Trennmaterialien in der Lebensmittelanalytik.

## Summary

Molecularly imprinted polymers (MIP) were synthesized and evaluated for the development of efficient methods which are suitable for sample clean-up and pre-concentration for the use in food analysis. Molecular imprinting technology is a synthetic approach to imitate natural molecular recognition. The imprinting process is performed by co-polymerising functional and cross-linking monomers in the presence of a template molecule corresponding to the target analyte or exhibiting a similar molecular structure. The subsequent removal of the imprint molecule reveals binding sites in the polymer network, which are complementary to the template in size, shape and position of the functional groups. This allows the highly specific rebinding of the template.

For the determination of the antibiotic chloramphenicol, different MIPs were synthesised via bulk polymerisation. Because of harmful side effects on human beings it has been prohibited to apply chloramphenicol to food-producing animals within the European Union. For the polymer synthesis the functional monomer 2VPy, DEAEMA or MAA and the template chloramphenicol or the structurally-related molecules florfenicol or thiamphenicol were used. To evaluate the imprinting effect of the MIPs and to identify the influence of mobile phase composition on the retention of chloramphenicol, HPLC analyses were performed. It can be concluded that the analyte was retained on the MIPs under apolar elution conditions via chloramphenicol selective hydrogen bondings. The strong retention of chloramphenicol under aqueous elution conditions results from additional non-selective hydrophobic interactions because MIPs as well as NIPs (non-imprinted polymer) showed only slightly different values for the retention of chloramphenicol under these conditions. Nevertheless, the molecular imprinting effect is also of relevance in solvents with high water content because the separation of chloramphenicol related to florfenicol and thiamphenicol on the MIPs was better as compared to the NIPs. The functional monomer used for polymer synthesis had a large influence on the recognition properties. In apolar solvents, polymers synthesized with 2VPy showed higher retention abilities and imprinting effects towards chloramphenicol than the polymers synthesized with DEAEMA or MAA. After chromatographic evaluation, the polymers were used as sorbents in manual solid phase extraction for the separation and pre-concentration of the target analyte. The results showed that, after washing with ethyl acetate, recoveries of nearly 100% were obtained when the MIP synthesized with 2VPy was used.

Solvent mixtures with a high content of water as washing solution resulted in recoveries of approximately 100% on all polymers. It was shown that recoveries of more than 90% from spiked honey samples could be observed after solid phase extraction. Honey represents a difficult matrix, so that analytic problems exist for controlling maximum permissible quantities. During the washing step a better separation of the honey matrix could be achieved with ethyl acetate than with an aqueous solution. This indicated selective interactions of chloramphenicol with the MIP under apolar conditions. In further experiments, the application of the polymers in an online-SPE coupled to a LC/MS-MS was investigated. Due to the highly selective binding of the target molecule a better separation of the matrix with a MIP could be achieved than with conventional reversed phase materials. Thus, the optimised MIPs appear to be well suited to suppress matrix effects and for the pre-concentration of the target molecule prior to chromatographic analysis so that the quantitative determination is not disturbed by interfering compounds.

Due to their size bioactive oligopeptides like nisin cannot diffuse through the highly cross-linked polymer matrix and consequently cannot reach the imprinted sites. Therefore, the method of hierarchical imprinting was used to synthesize polymers with high affinity towards nisin and Ala-Gly. This method resulted in imprinted polymers with binding sites located at the surface, which are capable of recognising larger molecules. According to the epitope approach, the polymers with high affinity towards nisin were imprinted with different amino acid sequences which were analogue to the C-terminal sequence of nisin. The chromatographic evaluation showed that the highest retention of nisin on nisin C-terminally analogously imprinted polymers could be obtained with acetonitrile/water-mixtures which contained more than 80% of water. The strong retention of the cationic peptide under aqueous elution conditions was based on selective ionic as well as hydrophobic interactions because nisin was not retained on the NIP. Furthermore, nisin was retained stronger on polymers which were imprinted with a longer amino acid sequence because of an obviously better sterical accessibility of the binding sites for the C-terminus of nisin. In the manual solid phase extraction recoveries of maximum 69% were obtained by using acetonitrile or acetonitrile with less than 10% water as washing solution. The reduced recoveries could be ascribed to the instability of nisin. On the basis of the present results, it can be concluded that the polymer imprinted with the C-terminal analogue sequence Lys-Ala-Val of nisin is applicable to the solid phase extraction of nisin.

The chromatographic evaluation of the polymers with affinity towards alanine and Ala-Gly, which is part of several bioactive peptides like ACE-inhibitors and cytomodulatory peptides, showed that their retention in apolar solvents was based on specific ionic interactions and hydrogen bondings. The retention in solvents with a higher content of water could be obtained by the insertion of a Fmoc-group in the analytes which results in non-specific hydrophobic interactions. The enlargement of the imprinted cavity by the additional imprinting of the Fmoc-group did not result in a higher retention of alanine and Ala-Gly. The amino acid and the dipeptide were not in a position to interact obviously optimally with these binding sites because of sterical reasons. The results of the HPLC analyses of the polymers with affinity towards Ala-Gly showed clearly that such MIPs are applicable to the separation of bioactive peptides.

Scanning electron micrographs showed morphological differences which illustrated the formation of porous structures and reflected the different retention and recognition properties towards the target analytes.

This is the first time that MIP synthesis which follows a conventional non-covalent molecular imprinting protocol using chloramphenicol or a structurally-related molecule as the template has been applied as a sorbent in solid phase extraction of honey samples prior to RP-HPLC or in combination with LC-MS/MS. Furthermore, polymers with an affinity towards the bioactive oligopeptide nisin or the peptide fragment Ala-Gly were synthesized for the first time. Thus, the results of this thesis represent the basis for the application of MIPs as selective separation materials for future applications in food analysis.

## 7. Literaturverzeichnis

Abjean, J.P. (1997); Planar chromatography for the multiclass, multiresidue screening of chloramphenicol, nitrofurantoin and sulfonamide residues in pork and beef; *Journal of AOAC international* 80: 737 – 740.

Alexander, C., Smith, C.R., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. (1999); Imprinted polymers as protecting groups for regioselective modification of polyfunctional substrates; *Journal of the American Chemical Society* 121 (28): 6640 – 6651.

Andersson, L.I., Müller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K. (1995); Mimics of the binding sites of opioid receptors obtained by molecular imprinting of enkephalin and morphine; *Proceedings of the National Academy of Science* 92: 4788 – 4792.

Andersson, L.I., Müller, R., Mosbach, K. (1996); Molecular imprinting of the endogenous neuropeptide Leu5-enkephalin and some derivatives thereof; *Macromolecular Rapid Communication* 17: 65 – 71.

Andersson, L.I., Paprica, A., Arvidsson, T. (1997); A highly selective solid phase extraction sorbent for pre-concentration of sameridine made by molecular imprinting; *Chromatographia* 46 (1/2): 57 – 62.

Andersson, H.S., Karlsson, J.G., Piletsky, S.P., Koch-Schmidt, A.C., Mosbach, K., Nicholls, I.A. (1999); Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II []: Influence of monomer–template ratio and sample load on retention and selectivity; *Journal of Chromatography A* 848: 39 – 49.

Andersson, L.I. (2000a); Molecular imprinting for drug bioanalysis: A review on the application of imprinted polymers to solid-phase extraction and binding assay; *Journal of Chromatography B* 739: 163 – 173.

Andersson, L.I. (2000b); Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry; *Journal of Chromatography B* 745: 3 – 13.

Ansell, R.J., Mosbach, K. (1997); Molecularly imprinted polymers by suspension polymerisation in perfluorocarbon liquids, with emphasis on the influence of the porogenic solvent; *Journal of Chromatography A* 787: 55 – 66.

Aranha, C., Gupta, S., Reddy, K.V.R. (2004); Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: in vitro and in vivo studies; *Contraception* 69 (4): 333 – 338.

Baggiani, C., Trotta, F., Giraudi, G., Moraglio, G., Vanni, A. (1997); Chromatographic characterization of a molecularly imprinted polymer binding theophylline in aqueous buffers; *Journal of Chromatography A* 786: 23 – 29.

Baggiani, C., Giovannoli, C., Anfossi, L., Tozzi, C. (2001); Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples; *Journal of Chromatography A* 938: 35 – 44.

Bellamy, W., Wakabayashi, H., Takase, M., Kawase, K., Shimamura, S., Tomita, M.B. (1993); Role of cell binding in the antibacterial mechanism of lactoferricin B; *Journal of Applied Bacteriology* 75: 478 – 484.

Berger, T., Bütikofer, U., Muralt, L., Rieder, K., Rhyn, P., Züst, C. (2005); Bestimmung von Nisin A in Käse mit LC/MS und LC/MS/MS; *Mitteilung Lebensmittel Hygiene* 96: 336 – 350.

Bjarnason, B., Chimuka, L., Ramström, O. (1999); On-line solid-phase extraction of triazines herbicides using a molecularly imprinted polymer for selective sample enrichment; *Analytical Chemistry* 71 (11): 2151 – 2156.

Boos, K.-S., Fleischer, C.T. (2001); Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP); *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371: 16 – 20.

Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J. (2001); *Drug residues in foods; Pharmacology, Food Safety, and Analysis*; Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.

Bouksamin, M., Fliss, I., Meghrou, J., Simard, R., Lacroix, C. (1998); Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence; *Journal of Applied Microbiology* 84: 176 – 184.

Boulaire, S.L., Bauduret, J.-C., Andre, F. (1997); Veterinary drug residues survey in meat : an hplc method with a matrix solid phase dispersion extraction; *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 45 : 2134 – 2142.

Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998 Teil I Nr. 8; ausgegeben zu Bonn am 5. Februar 1998; Fassung vom 29. Januar 1998; Zusatzstoff-Zulassungsverordnung Anlage 5 Teil C (zu § 5 Abschnitt 1 und § 7); S. 264.

Burns, L.E., Hodgman, J.E., Cass, A.B. (1959); Fatal circulatory collapse in premature infants receiving chloramphenicol; *The New England Journal of Medicine* 261: 1318 – 1321.

Cacho, C., Turiel, E., Martin-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Cámara, C. (2004); Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation; *Journal of Chromatography B* 802: 347 – 353.

Caro, E., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Borrull, F. (2003); On-line solid-phase extraction with molecularly imprinted polymers to selectively extract substituted 4-chlorophenols and 4-Nitrophenol from water; *Journal of Chromatography A* 955: 233 – 238.

Caro, E., Marcé, R.M., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Borrull, F. (2004); A new molecularly imprinted polymer for the selective extraction of naproxen from urine samples by solid-phase extraction; *Journal of Chromatography B* 813: 137 – 143.

Carter, S., Lu, S.-Y., Rimmer, S. (2003); Core-shell molecular imprinted polymer colloids; *Supramolecular Chemistry* 15 (3): 213 – 220.

Cha, D.S., Chinnan, M.S. (2003); Emerging role of nisin in food and packaging systems; *Food Science and Biotechnology* 12 (2): 206 – 212.

Chapuis, F., Pichon, V., Lanza, F., Sellergren, S., Hennion, M.-C. (2003); Optimization of the class-selective extraction of triazines from aqueous samples using a molecularly imprinted polymer by a comprehensive approach of the retention mechanism; *Journal of Chromatography A* 999: 23 – 33.

Chianella, I., Karim, K., Piletska, E.V., Preston, C., Piletsky, S.A. (2006); Computational design and synthesis of molecularly imprinted polymers with high binding capacity for pharmaceutical applications-model case: Adsorbent for abacavir; *Analytica Chimica Acta* 559: 73 – 78.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001); Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation; *International Journal of Food Microbiology* 71: 1 – 20.

Cobb, Z., Andersson, L.I. (2005); Determination of ropivacaine in human plasma using highly selective molecular imprint-based solid phase extraction and fast LC–MS analysis; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383: 645 – 650.

Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. (2004); Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation; *Journal of Chromatography B* 804: 173 – 182.

Daniel, H., Vohwinkel, M., Renner, G. (1990); Effect of casein and  $\beta$ -casomorphins on gastrointestinal motility in rats; *The Journal of Nutrition* 120: 252 – 257.

Dauwe, C., Sellergren, B. (1996); Influence of template basicity and hydrophobicity on the molecular recognition properties of molecularly imprinted polymers; *Journal of Chromatography A* 753: 191 – 200.

Delves-Broughton, J. (1990); Nisin and its uses as a food preservative; *Food Technology* 44 (11): 100 – 117.

Dickert, F.L., Achatz, P., Halikias, K. (2001); Double molecular imprinting – a new sensor concept for improving selectivity in the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water; *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 371 (1): 11 – 15.

Dziuba, J., Minkiewicz, D., Natecz, D., Iwaniak, A. (1999); Database of biologically active peptide sequences; *Nahrung/Food* 43: 190 – 195.

Ehrlich, J., Bartz, O.R., Smith, A. (1947); Chlormycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete; *Science* 106: 417 – 419.

Falahee, M.B., Adams, M.R., Dale, J.W., Morris, B.A. (1990); An enzyme immunoassay for nisin; *International Journal of Food Science and Technology* 25: 590 – 595.

FitzGerald, R.J., Meisel, H. (1999); Lactokinins: whey protein-derived ACE inhibitory peptides; *Nahrung/Food* 43 (3): 165 – 167.



Forti, A.F., Campana, G., Simonella, A., Multari, M., Scortichini, G. (2005); Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *Analytica Chimica Acta* 529: 257 – 263.

Gill, H.S., Doull, F., Rutherford, K.J., Cross, M.L. ( 2000); Immunoregulatory peptides in bovine milk; *British Journal of Nutrition* 84 Supplement 1: 111 – 117.

Gong, J.L., Gong, F.C., Kuang, Y., Zeng, G.M. Shen, G.L., Yu, R.Q. (2004); Capacitive chemical sensor for fenvalerate assay based on electropolymerized molecularly imprinted polymer as the sensitive layer; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (2): 302 – 307.

Grotewahl, D. (2006); Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Chloramphenicol in Bienenprodukten mittels LC-MS; Dissertation der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Aus dem Institut für Chemie und Technologie der Milch, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel; Cuvillier Verlag, Göttingen; ISBN 3-86537-882-X.

Hadden, J.W. (1991); Immunotherapy of human immunodeficiency virus infection; *Trends in Pharmaceutical Science* 12: 107 – 111.

Haginaka, J., Takehira, H., Hosoya, K., Tanaka, N. (1998); Molecularly imprinted uniform-sized polymer-based stationary phase for naproxen. Comparison of molecular recognition ability of the molecularly imprinted polymers prepared by thermal and redox polymerization techniques; *Journal of Chromatography A* 816: 113 – 121.

Haginaka, J. Sakai, Y. (2000); Uniform-sized molecularly imprinted polymer material for (S)-propranolol; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22: 899 – 907.

Haginaka, J., Sanbe, H. (2001); Uniformly sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen. Retention and molecular recognition properties in aqueous mobile phase; *Journal of Chromatography A* 913: 141 – 146.

Haginaka, J., Kagawa, C. (2004); Retentivity and enantioselectivity of uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine and -brompheniramine in hydro-organic mobile phases; *Journal of Chromatography B* 804: 19 – 24.

Hagiwara, T., Shinoda, I., Fukuwatari, Y., Shimamura, S. (1995); Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor; *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59 (10): 1875 – 1881.

Hakovirta, J., Reunanen, J., Saris, P.E.J. (2006); Bioassay for nisin in milk, processed cheese, salad dressings, canned tomatoes, and liquid egg products; *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1001 – 1005.

Hansen, J.N. (1997); Nisin and related antimicrobial peptides; in: Strohl, W.R. (ed.); *Biotechnology of Antibiotics*; New York Marcell Dekker: 437 – 470.

Hart, B.R., Shea, K.J. (2002); Molecular imprinting for the recognition of N-terminal histidine peptides in aqueous solution; *Macromolecules* 35: 6192 – 6201.

Hata, I., Higashiyama, S., Otani, H. (1998); Identification of a phosphopeptide in bovine [alpha]<sub>s1</sub>-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures; *Journal of Dairy Research* 65: 569 – 578.

Hey, H. (2003); Rechtssicherheit und Vertrauensschutz im Widerstreit, zur Analytik bei verbotenen pharmakologisch wirksamen Stoffen; *Zeitschrift für das gesamte Lebensmittelrecht* 5: 658 – 665.

Holt, D., Harvey, D., Hurley, R. (1993); Chloramphenicol toxicity; *Adverse Drug Reaction Toxicology Reviews* 12 (2): 83 – 95.

Hosoya, K., Fréchet, J.M.J. (1993); Influence of the seed polymer on the chromatographic properties of size monodisperse polymeric separation media prepared by a multi-step swelling and polymerization method; *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 31: 2129 – 2141.

Hosoya, K., Yoshizako, K., Shirasu, Y., Kimata, K., Araki, T., Tanaka, N., Haginaka, J. (1996); Molecularly imprinted uniform-size polymer-based stationary phase for high-performance liquid chromatography. Structural contribution of cross-linked polymer network on specific molecular recognition; *Journal of Chromatography A* 728: 139 – 147.

Hosoya, K., Shirasu, Y., Kimata, K., Tanaka, N. (1998); Molecularly imprinted chiral stationary phase prepared with racemic template; *Analytical Chemistry* 70: 943 – 945.

Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Yoshizako, K., Kimata, K., Tanaka, N., Takehira, H., Haginaka, J. (1999); An unexpected molecular imprinting effect for a polyaromatic hydrocarbon, anthracene, using uniform size ethylene dimethacrylate particles; *Journal of High Resolution Chromatography* 22 (5): 256 – 260.

Hu, S.-G., Li, L., He, X.-W. (2005); Comparison of trimethoprim molecularly imprinted polymers in bulk and in sphere as the sorbent for solid-phase extraction and extraction of trimethoprim from human urine and pharmaceutical tablet and their determination by high-performance liquid chromatography; *Analytica Chimica Acta* 537: 215 – 222.

Huang, X. Qin, F., Chen, X., Liu, Y, Zou, H. (2004); Short columns with molecularly imprinted monolithic stationary phases for rapid separation of diastereomers and enantiomers; *Journal of Chromatography B* 804: 13 – 18.

Hübschmann, H.-J. (1996); *Handbuch der GC/MS, Grundlagen und Anwendung*; VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio.

Hurst, A. (1981); Nisin; *Advances in Applied Microbiology* 27: 85 – 123.

Hwang, C.C., Lee, W.C. (2001); Chromatographic resolution of the enantiomers of phenylpropanolamine by using molecularly imprinted polymer as the stationary phase; *Journal of Chromatography B* 765: 45 – 53.

Impens, S., Reybroeck, W., Vercammen, J., Courtheyn, D., Ooghe, S., DeWash, K., Smedts, W., DeBrabander, H. (2003); Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2; *Analytica Chimica Acta* 483: 153 – 163.

Jollé, P., Lévy-Toledano, S., Fiat, A.M., Soria, C., Gillessen, D., Thomaidis, A., Dunn, F.W., Caen, J.B. (1986); Analogy between fibrinogen and casein. Effect of an undecapeptide isolated from kappa-casein on platelet function; *European Journal of Biochemistry* 158: 379 – 384.

Kempe, M., Mosbach, K. (1995); Molecular imprinting used for chiral separations; *Journal of Chromatography A* 694: 3 – 13.

Kempe, M. (1996); Antibody-mimicking polymers as chiral stationary phases in HPLC; *Analytical Chemistry* 68 (11): 1948 – 1953.

Kempe, M. (2000); Oxytocin receptor mimetics prepared by molecular imprinting; *Letters in Peptide Science* 7: 27 – 33.

Kempe, H., Kempe, M. (2004); Novel method for the synthesis of molecularly imprinted polymer bead libraries; *Macromolecular Rapid Communications* 25: 315 – 320.

Kempe, H., Kempe, M. (2006); Development and evaluation of spherical molecularly imprinted polymer beads; *Analytical Chemistry* 78 (11): 3659 – 3666.

Khasawneh, M.A., Vallano, P.T., Remcho, V.T. (2001); Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents. II. Covalent imprinted polymers; *Journal of Chromatography A* 922: 87 – 97.

Kim, J.M., Ahn, K.-D., Wulff, G. (2000); Cholesterol esterase activity of a molecularly imprinted polymer; *Macromolecular Chemistry and Physics* 202 (7): 1105 – 1108.

Koeber, R., Fleischer, C., Lanza, F., Boos, K.-S., Sellergren, B., Barceló, D. (2001); Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers; *Analytical Chemistry* 73 (11): 2437 – 2444.

Kordel, M., Sahl, H.-G. (1986); Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides pep5 and nisin; *FEMS Microbiological Letters* 34: 139 – 144.

Kröger, S., Turner, A.P.F., Mosbach, K., Haupt, K. (1999); Imprinted polymer-based sensor system for herbicides using differential-pulse voltammetry on screen-printed electrodes; *Analytical Chemistry* 71 (17): 3698 – 3702.

Kromidas, S. (1999): *Validierung in der Analytik*; Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto.

Lancaster, T., Swart, A.M., Jick, H. (1998); Risk of serious haematological toxicity with use of chloramphenicol eye drops in a British general practice database; *British Medical Journal* 316: 667.

Lanza, F., Sellergren, B. (1999); Method for Synthesis and Screening of Large Groups of Molecularly Imprinted Polymers; *Analytical Chemistry* 71 (11): 2092 – 2096.

Lanza, F., Hall, A.J., Sellergren, B., Bereczki, A., Horvai, G., Bayoudh, S., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C. (2001); Development of a semiautomated procedure for the synthesis and evaluation of molecularly imprinted polymers applied to the search for functional monomers for phenytoin and nifedipine; *Analytica Chimica Acta* 435: 91 – 106.

Lanza, F., Sellergren, B. (2001); The application of molecular imprinting technology to solid phase extraction; *Chromatographia* 53: 599 – 611.

Lanza, F., Sellergren, B. (2004); Molecularly imprinted polymers via high-throughput and combinatorial techniques; *Macromolecular Rapid Communications* 25: 59 – 68.

Leung, P.P., Khadre, M., Shellhammer, T.H., Yousef, A.E. (2002); Immunoassay method for quantitative determination of nisin in solution and on polymeric films; *Letters in Applied Microbiology* 34: 199 – 204.

Levi, R., McNiven, S., Piletsky, S.A., Cheong, S.-H., Yano, K., Karube, I. (1997); Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers; *Analytical Chemistry* 69 (11): 2017 – 2021.

Liu, J.-Q., Wulff, G. (2004); Molecularly imprinted polymers with strong carboxypeptidase A-like activity: combination of an amidinium function with a zinc-ion binding site in transition-state imprinted cavities; *Angewandte Chemie International Edition* 43 (10): 1287 – 1290.

Lu, Y., Li, C., Wang, X., Sun, P., Xing, X. (2004); Influence of polymerization temperature on the molecular recognition of imprinted polymers; *Journal of Chromatography B* 804: 53 – 59.

Luchansky, J.B., Call, J.E. (2004); Evaluation of nisin-coated cellulose casings for the control of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of commercially prepared frankfurters; *Journal of Food Protection* 67 (5): 1017 – 1021.

Luo, C., Liu, M., Mo, Y., Qu, J., Feng, Y. (2001); Thickness-shear mode acoustic sensor for atrazine using molecularly imprinted polymer as recognition element; *Analytica Chimica Acta* 428 (1): 143 – 148.

Maher, S., McClean, S. (2006); Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro; *Biochemical Pharmacology* 7: 289 – 298.

Mahony, J.O., Nolan, K., Smyth, M.R., Mizaikoff, B. (2005); Molecularly imprinted polymers – potential and challenges in analytical chemistry; *Analytica Chimica Acta* 534: 31 – 39.

Marek, M., Kralova, E., Stastnikova, V., Dobias, J., Voldoich, M., Dobian, J., Vodoeich, M. (2004); Food packaging materials with preservative coating; *PCT International Application* WO 2004056214.

Martin-Esteban, A. (2001); Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 370: 795 – 802.

Martin-Esteban, A., Turiel, E., Stevenson, D. (2001); Effect of template size on the selectivity of molecularly imprinted polymers for phenylurea herbicides; *Chromatographia* 53 Supplement: S434 – S437.

Matsui, J., Kato, T., Takeuchi, T., Suzuki, M., Yokoyama, K., Tamiya, E., Karube, I. (1993); Molecular recognition in continuous polymer rods prepared by a molecular imprinting technique; *Analytical Chemistry* 65: 2223 – 2224.

Matsui, J., Takeuchi, T. (1997); A molecularly imprinted polymer rod as nicotine selective affinity media prepared with 2-(trifluoromethyl)acrylic acid; *Analytical Communication* 34: 199 – 200.

Matsui, J., Okada, M., Tsuruoka, M., Takeuchi, T. (1997); Solid-phase extraction of a triazine herbicide using a molecularly imprinted synthetic receptor; *Analytical Communications* 34: 85 – 87.

Matsui, J., Fujiwara, K., Ugata, S., Takeuchi, T. (2000); Solid-phase extraction with a dibutylmelamine-imprinted polymer as triazine herbicide-selective sorbent; *Journal of Chromatography A* 889: 25 – 31.

Mayes, A.G., Mosbach, K. (1996); Molecularly imprinted polymer beads: suspension polymerization using a liquid perfluorocarbon as the dispersing phase; *Analytical Chemistry* 68 (21): 3769 – 3774.

McNiven, S., Kato, M., Levi, R., Yano, K., Karube, I. (1998); Chloramphenicol sensor based on an in situ imprinted polymer; *Analytica Chimica Acta* 365: 69 – 74.

Meisel, H., Schlimme, E. (1994); in: Brantl, V.; Teschemacher, H., (ed.);  $\beta$ -Casomorphins and related peptides: recent developments; VCH, Weinheim: 27 – 33.

Meisel, H., FitzGerald, R.J. (2003); Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects; *Current Pharmaceutical Design* 9: 1289 – 1295.

Meisel, H. (2005); Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins; *Current Medicinal Chemistry* 12: 1905 – 1919.

Meisel, H., Walsh, D.J., Murray, B., FitzGerald, R.J. (2006); ACE inhibitory peptides; in: Mine, Y., Shahidi, F. (ed.); *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*; Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York; ISBN 0-8247-5354-2.

Mena, M.L., Agüí, L., Martines-Ruiz, P., Yáñez-Sedeño, P., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.M. (2003); Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376: 18 – 25.

Möder, M., Schellin, M., Popp, P. (2006); Miniaturisierte Probenvorbereitungstechniken zur Bestimmung von organischen Verbindungen in wässrigen Proben; LC-GC Oktober 2006: 28 – 35.

Möller, K. Nilsson, U., Crescenzi, C. (2004); Investigation of matrix effects of urine on a molecularly imprinted solid-phase extraction; Journal of Chromatography B 811: 171 – 176.

Mosbach, K., Ramström, O. (1996); The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology; Bio/Technology 14: 163 – 170.

Mullet, W.M., Lai, E.P.C. (1998); Determination of theophylline in serum by molecularly imprinted solid-phase extraction with pulsed elution; Analytical Chemistry 70 (17): 3636 – 3641.

Nandakumar, R., Nandakumar, M.P., Mattiasson, B. (2000); Quantification of nisin in flow-injection immunoassay systems; Biosensors and Bioelectronics 15: 241 – 247.

Nicholls, I.A., Ramström, O., Mosbach, K. (1995); Insight into the role of the hydrogen bond and hydrophobic effect on recognition in molecularly imprinted polymer synthetic peptide receptor mimics; Journal of Chromatography A 691: 349 – 353.

Nicholls, I.A., Adbo, K., Andersson, H.S., Andersson, P.O., Ankarloo, J., Hedin-Dahlström, J., Jokela, P., Karlsson, J.G., Olofsson, L., Rosengren, J., Shoravi, S., Svenson, J., Wikman, S. (2001); Can we rationally design molecularly imprinted polymers?; Analytica Chimica Acta 435: 9 – 18.

Nicolich, R.S., Werneck-Barroso, E., Marques, M.A.S. (2006); Food safety evaluation: detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Analytica Chimica Acta 565: 97 – 102.

Ortelli, D., Edder, P., Corvi, C. (2004); Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Chromatographia 59: 61 – 64.

Pap, T. Horváth, Tolokán, A., Horvai, G., Sellergren, B. (2002); Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction; Journal of Chromatography A 973: 1 – 12.

Penney, L., Smith, A., Coates, B., Wijewickreme, A. (2005); Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry; Journal of AOAC International 88: 645 – 653.

Pérez, N., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N. (2000); Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization; Journal of Applied Polymer Science 77: 1851 – 1859.

Pérez-Moral, N., Mayes, A.G. (2002); Novel MIP formats; Bioseparation 10: 287 – 299.

Pérez-Moral, N., Mayes, A.G. (2004); Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods; Analytica Chimica Acta 504: 15 – 21.

Pfeiffer, P., Orben, C. (1997); Bestimmung von Nisin in Wein nach Festphasenextraktion und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie; Deutsche Lebensmittel-Rundschau 93 (2): 47 – 49.

Piletsky, S.A., Andersson, H.S., Nicholls, I.A. (1998); The rational use of hydrophobic effect-based recognition in molecularly imprinted polymers; Journal of Molecular Recognition 11: 94 – 97.

Quon, D. (2006); Peer validation of a method to confirm chloramphenicol in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Journal of AOAC International 89 (2): 586 – 593.

Rachkov, A., Minoura, N. (2000); Recognition of oxytocin and oxytocin-related peptides in aqueous media using a molecularly imprinted polymer synthesized by the epitope approach; Journal of Chromatography A 889: 111 – 118.

Rachkov, A., Minoura, N. (2001); Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach; Biochimica et Biophysica Acta 1544: 255 – 266.

Rachkov, A., Hu, M., Bulgarovich, E., Matsumoto, T., Minoura, N. (2004); Molecularly imprinted polymers prepared in aqueous solution selective for [Sar<sup>1</sup>, Ala<sup>8</sup>]angiotensin II; Analytica Chimica Acta 504: 191 – 197.

Ramström, O., Nicholls, I.A., Mosbach, K. (1994); Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers; Tetrahedron 5 (4): 649 – 656.

Remcho, V.T., Tan, Z.J. (1999); MIPs as chromatographic stationary phases for molecular recognition; Analytical Chemistry News & Features: 248A – 255A.

Reunanen, J., Saris, P.E.J. (2003); Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence; Applied and Environmental Microbiology 69 (7): 4214 – 4218.

Reynolds, E.C. (1997); Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions; Journal of Dental Research 76: 1587 – 1595.

Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Kontrollmaßnahmen hinsichtlich bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen; ABl. L 125 vom 23.5.1996.

Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (1995); Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering; Applied and Environmental Microbiology 61 (8): 2873 – 2878.

Rønning, H.T., Einarsen, K., Asp, T.N. (2006); Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC; Journal of Chromatography A 1118: 226 – 233.

Rosengren, A.M., Karlsson, J.G., Andersson, P.O., Nicholls, I.A. (2005); Chemometric models of template-molecularly imprinted polymer binding; *Analytical Chemistry* 77 (17): 5700 – 5705.

Rossano, R., Del Fiore, A., D'Elia, A., Pesole, G., Parente, E., Riccio, P. (1998); New procedure for the determination of nisin in milk; *Biotechnology Techniques* 12 (10): 783 – 786.

Roudaut, B. (1996); High performance liquid chromatography with UV detection and scanning UV confirmation of chloramphenicol in fatty liver; *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 19: 1097 – 1105.

Ruhr, E., Sahl, H.-G. (1985); Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles; *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 27 (5): 841 – 845.

Sajonz, P., Kele, M., Zhong, G., Sellergren, B., Guiochon, G. (1998); Study of the thermodynamics and mass transfer kinetics of two enantiomers on a polymeric imprinted stationary phase; *Journal of Chromatography A* 810: 1 – 17.

Sallami, L., Kheadr, E.E., Fliss, I., Vuilleumard, J.C. (2004); Impact of autolytic, proteolytic, and nisin-producing adjunct cultures on biochemical and textural properties of cheddar cheese; *Journal of Dairy Science* 87: 1585 – 1594.

Sato, R., Naguchi, T., Naito, H. (1986); Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from ligated segment of rat small intestine; *Journal of Nutrition Science and Vitaminology* 32: 67 – 76.

Schirmer, C., Meisel, H. (2004); Aminosäurezusammensetzung verschiedener Konsummilchen; *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 56 (1): 5 – 23.

Schirmer, C., Meisel, H. (2006); Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey; *Journal of Chromatography A* 1132: 325 – 328.

Schusdziarra, V., Schick, R., de la Fuente, A., Holland, A., Brantl, V., Pfeiffer, E.F. (1983); Effect of beta-casomorphins on somatostatin release in dogs; *Endocrinology* 112: 1948 – 1951.

Scortichini, G., Annunziata, L., Haouet, M.N., Benedett, F., Krusteva, I., Galarini, R. (2005); ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk: method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria; *Analytica Chimica Acta* 535: 43 – 48.

Sellergren, B., Shea, K.J. (1993); Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers; *Journal of Chromatography* 635: 31 – 49.

Sellergren, B. (1994a); Direct drug determination by selective sample enrichment on an imprinted polymer; *Analytical Chemistry* 66 (9): 1578 – 1582.



Sellergren, B. (1994b); in: Subramanian, M. (ed.); Chiral separations by liquid chromatography; VCH, Weinheim, p.69.

Sellergren; B. (1994c); Imprinted dispersion polymers: a new class of easily accessible affinity stationary phases; *Journal of Chromatography A* 673: 133 – 141.

Sellergren, B., Shea, K.J. (1995); Origin of peak asymmetry and the effect of temperature on solute retention in enantiomer separations on imprinted chiral stationary phases; *Journal of Chromatography A* 690: 29 – 39.

Sellergren, B. (1999); Polymer- and template-related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions; *Trends in Analytical Chemistry* 18 (3): 164 – 174.

Sellergren, B. (2001); Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A* 906: 227 – 252.

Shen, H.Y., Jiang, H.L. (2005); Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UV, GC-ECD, GC-MS-EL-SIM and GCMS-NCI-SIM methods; *Analytica Chimica Acta* 535: 33 – 41.

Shim, Y.-H., Yilmaz, E., Lavielle, S., Haupt, K. (2004); Chiral recognition and separation of  $\beta^2$ -amino acids using non-covalently molecularly imprinted polymers; *Analyst* 129: 1211 – 1215.

Simon, R., Houck, S., Spivak, D.A. (2005); Comparison of particle size and flow rate optimization for chromatography using one-monomer molecularly imprinted polymers versus traditional non-covalent molecularly imprinted polymers; *Analytica Chimica Acta* 542: 104 – 110.

Spivak, D.A., Simon, R., Campbell, J. (2004); Evidence for shape selectivity in non-covalently imprinted polymers; *Analytica Chimica Acta* 504: 23 – 30.

Spivak, D.A. (2005); Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers; *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1779 – 1794.

Suárez, A.M., Azcona, J.I., Rodríguez, J.M., Sanz, B., Hernández, P.E. (1997); One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography; *Applied and Environmental Microbiology* 63 (12): 4990 – 4992.

Suárez-Rodríguez, J.L., Díaz-García; M.E. (2001); Fluorescent competitive flow-Through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers; *Biosensors and Bioelectronics* 16: 955 – 961.

Suedee, R., Srichana, T., Chuchome, T., Kongmark, U. (2004); Use of molecularly imprinted polymers from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal of tetracycline from water; *Journal of Chromatography B* 811: 191 – 200.

Svenson, J., Nicholls, I.A. (2001); On the thermal and chemical stability of molecularly imprinted polymers; *Analytica Chimica Acta* 435: 19 – 24.

Szabelski, P., Kaczmarzski, K., Cavazzini, A., Chen, Y.-B., Sellergren, B., Guiochon, G. (2002); Energetic heterogeneity of the surface of a molecularly imprinted polymer studied by high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A* 964: 99 – 111.

Takeuchi, T., Fukuma, D., Matsui, J. (1999); Combinatorial molecular imprinting: an approach to synthetic polymer receptors; *Analytical Chemistry* 71 (2): 285 – 290.

Takeuchi, T., Fukuma, D., Matsui, J., Mukawa, T. (2001a); Combinatorial molecular imprinting for formation of atrazine decomposing polymers; *Chemistry Letters* 30 (6): 530 – 531.

Takeuchi, T., Seko, A., Matsui, J., Mukawa, T. (2001b); Molecularly imprinted polymer library on a microtiter plate. High-throughput synthesis and assessment of cinchona alkaloid-imprinted polymers; *Instrumentation science and Technology* 29 (1): 1 – 9.

Takino, M., Daishima, S., Nakahara, T. (2003); Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry; *Journal of Chromatography A* 1011: 67 – 75.

Tamayo, F.G., Casillas, J.L., Martin-Esteban, A. (2003); Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples; *Analytica Chimica Acta* 482: 165 – 173.

Theodoridis, G., Zacharis, C.K., Tzanavaras, P.D., Themelis, D.G., Economou, A. (2004); Automated sample preparation based on the sequential injection principle solid-phase extraction on a molecularly imprinted polymer coupled on-line to high-performance liquid chromatography; *Journal of Chromatography A* 1030: 69 – 76.

Titirici, M.M., Hall, A.J., Sellergren, B. (2002); Hierarchically imprinted stationary phases: mesoporous polymer beads containing surface-confined binding sites for adenine; *Chemistry of Materials* 14: 21 – 23.

Titirici, M.M., Hall, A.J., Sellergren, B. (2003); Hierarchical imprinting using crude solid phase peptide synthesis products as templates; *Chemistry of Materials* 15: 822 – 824.

Titirici, M.M., Sellergren, B. (2004); Peptide recognition via hierarchical imprinting; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378: 1913 – 1921.

Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K.J. (1991); Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin; *Journal of Dairy Science* 74: 4137 – 4142.

Turner, N.W., Piletska, E.V., Karim, K., Whitcombe, M., Malecha, M., Magan, N., Baggiani, C., Piletsky, S.A. (2004); Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A; *Biosensors and Bioelectronics* 20: 1060 – 1067.

Turner, S.R., Love, R.M., Lyons, K.M. (2004); An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine; *International endodontic journal* 37 (10): 664 – 671.

US Patent 20040072341 (2004); Bioactive oligopeptides.

Vallano, P.T., Remcho, V.T. (2000); Affinity screening by packed capillary high performance liquid chromatography using molecular imprinted sorbents. I. Demonstration of feasibility; *Journal of Chromatography A* 888: 23 – 34.

Van de Riet, J.M., Potter, R.A., Christie-Fougere, M., Burns, B.G. (2003); Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry; *Journal of AOAC International* 86: 510 – 514.

Verordnung (EWG) Nr. 2377/90 des Rates vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs (ABl. Nr. L 224 S. 1).

Wang, H.Y., Xia, S.L., Sun, H., Liu, Y.K., Cao, S.K., Kobayashi, T. (2004); Molecularly imprinted copolymer membranes functionalized by phase inversion imprinting for uracil recognition and permselective binding; *Journal of Chromatography B* 804: 127 – 134.

Watabe, Y., Kubo, T., Nishikawa, T., Fujita, T., Kaya, K., Hosoya, K. (2006); Fully automated liquid chromatography–mass spectrometry determination of 17 $\beta$ -estradiol in river water; *Journal of Chromatography A* 1120: 252 – 259.

Wulff, G. (1995); Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the aid of molecular templates – a way towards artificial antibodies; *Angewandte Chemie International Edition* 34: 1812 – 1832.

Wulff, G., Gross, T., Schönfeld, R. (1997); Enzyme models based on molecularly imprinted polymers with strong esterase activity; *Angewandte Chemie International Edition* 36: 1962 – 1964.

Wulff, G. (2002); Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers; *Chemical Reviews* 102 (1): 1 – 28.

Xie, J., Chen, L., Li, C., Xu, X. (2003); Selective extraction of functional components derived from herb in plasma by using a molecularly imprinted polymer based on 2,2-bis(hydroxymethyl)butanol trimethacrylate; *Journal of Chromatography B* 788: 233 – 242.

Xie, M.X., Liu, Y., Qiu, Y.M., Han, J., Liu, Y.Z. (2005); Determination of chloramphenicol residue in animal tissues by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry; *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 33: 1 – 4.

Yano, K., Nakagiri, T., Takeuchi, T., Matsui, J., Ikebukuro, K., Karube, I. (1997); Stereoselective recognition of Dipeptide derivatives in molecularly imprinted polymers which incorporate an L-valine derivative as a novel functional monomer; *Analytica Chimica Acta* 357: 91 – 98.

Yano, K., Karube, I. (1999); Molecularly imprinted polymers for biosensor applications; *Trends in Analytical Chemistry* 18 (3): 199 – 204.

Ye, L., Cormack, A.G., Mosbach, K. (1999a); Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay; *Analytical Communication* 36: 35 – 38.

Ye, L., Ramström, O., Ansell, R., Nansson, J.-O., Mosbach, K. (1999b); Use of molecularly imprinted polymers in a biotransformation process; *Biotechnology and Bioengineering* 64 (6): 650 – 655.

Ye, L., Mosbach, K. (2001); The technique of molecular imprinting – principle, state of the art, and future aspects; *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 41: 107 – 113.

Yilmaz, E., Mosbach, K., Haupt, K. (1999); Influence of functional and cross-linking monomers and the amount of template on the performance of molecularly imprinted polymers in binding assay; *Analytical Communication* 36: 167 – 170.

Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K. (2000); The use of immobilized templates - a new approach in molecular imprinting; *Angewandte Chemie International Edition* 39 (12): 2115 – 2118..

Yilmaz, E., Ramström, O., Möller, P., Sanchez, D., Mosbach, K. (2002); A facile method for preparing molecularly imprinted polymer spheres using spherical silica templates; *Journal of Material Chemistry* 12: 1577 – 1581.

Yu, C., Mosbach, K. (2000); Influence of mobile phase composition and cross-linking density on the enantiomeric recognition properties of molecularly imprinted polymers; *Journal of Chromatography A* 888: 63 – 72.

Yunis, A.A. (1988); Chloramphenicol: relation of structure to activity and toxicity; *Annual reviews* 28: 83 – 100.

Zander, Å., Findlay, P., Renner, T., Sellergren, B. (1998); Analysis of nicotine and its oxidation products in nicotine chewing gum by a molecularly imprinted solid-phase extraction; *Analytical Chemistry* 70 (15): 3304 – 3314.

## A. Anhang

### A1. Chloramphenicol geprägte Polymere

Tab. A-1: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(MAA) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	K Chloramphenicol				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	0,41	0,15	0,24	0,24	
<b>99 : 1*</b>	0,27	0,19			0,21
<b>95 : 5*</b>	0,13	0,12			0,13
<b>90 : 10</b>	0,07	0,07	0,50	0,49	0,08
<b>80 : 20</b>	0,06	0,06	0,92	0,92	0,05
<b>70 : 30</b>	0,11	0,11	1,83	1,83	
<b>60 : 40</b>	0,23	0,22	4,02	3,97	0,03
<b>40 : 60</b>	0,66	0,67	12,91	11,39	0,04
<b>30 : 70</b>	1,78	1,82	31,80	28,38	
<b>20 : 80</b>	6,50	6,75	74,28	68,90	0,07
<b>15 : 85</b>	14,30	14,77			
<b>10 : 90</b>	37,74	38,78			0,14
<b>5 : 95</b>					

Tab. A-2: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(MAA) unter Verwendung verschiedener mobiler Phase

(v/v)	K Florfenicol					K Thiamphenicol				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	0,15	0,18	0,40	0,42		0,29	0,07	0,22	0,22	
<b>99 : 1*</b>	0,10	0,05			0,08	0,19	0,12			0,14
<b>95 : 5*</b>	0,05	0,02			0,06	0,07	0,05			0,07
<b>90 : 10</b>	0,04		0,54		0,04	0,02		0,23		0,03
<b>80 : 20</b>	0,05	0,04	0,85	0,88	0,02	-0,02	-0,02	0,30	0,31	0,02
<b>70 : 30</b>	0,10		1,53			-0,03		0,49		
<b>60 : 40</b>	0,21	0,28	3,32	3,53	0,02	0,03	0,00	0,98	1,08	0,02
<b>40 : 60</b>	0,49	0,36	5,02	5,44	0,01	0,11	0,02	1,44	1,52	0,03
<b>30 : 70</b>	1,09		12,70			0,20		3,37		
<b>20 : 80</b>	3,94	3,72	36,72	39,35	0,08	0,83	0,75	8,31	9,20	0,03
<b>15 : 85</b>	9,18					1,91				
<b>10 : 90</b>	23,65	23,88			0,20	4,83	4,78			0,10
<b>5 : 95</b>										

Tab. A-3: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(CAP\_MAA) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

	<b>K<sub>Chloramphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	1,01	0,43	0,29	0,27	
<b>99 : 1*</b>	0,55	0,32			0,46
<b>95 : 5*</b>	0,18	0,06			0,17
<b>90 : 10</b>	0,09	0,08	0,56	0,54	0,09
<b>80 : 20</b>	0,08	0,07	1,05	1,00	0,05
<b>70 : 30</b>	0,12	0,12	2,14	1,97	0,03
<b>60 : 40</b>	0,23	0,24	4,73	4,22	0,03
<b>40 : 60</b>	0,68	0,72	11,85	13,46	0,04
<b>30 : 70</b>	1,92	1,94	29,74	32,54	0,06
<b>20 : 80</b>	7,12	7,29	81,63	76,12	0,08
<b>15 : 85</b>	16,22	16,17			
<b>10 : 90</b>	41,60	40,26			0,13
<b>5 : 95</b>					

Tab. A-4: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(CAP\_MAA) unter Verwendung verschiedener mobilen Phase

	<b>K<sub>Florfenicol</sub></b>					<b>K<sub>Thiamphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	0,38	0,06	0,44	0,43		0,69	0,24	0,25	0,24	
<b>99 : 1*</b>	0,25	0,43			0,29	0,37	0,18			0,30
<b>95 : 5*</b>	0,07	-0,02			0,06	0,10	0,00			0,09
<b>90 : 10</b>	0,06		0,55		0,04	0,07		0,23		0,05
<b>80 : 20</b>	0,05	-0,02	0,97	0,97	0,02	0,05	-0,09	0,40	0,35	0,03
<b>70 : 30</b>	0,08		1,43		0,01	0,02		0,45		0,02
<b>60 : 40</b>	0,18	0,26	2,92	3,92	0,02	0,01	-0,04	0,89	1,02	0,02
<b>40 : 60</b>	0,44	0,39	4,35	5,47	0,03	0,03	-0,03	1,37	1,51	0,03
<b>30 : 70</b>	1,37		12,67		0,07	0,30		3,17		0,04
<b>20 : 80</b>	5,41	4,11	37,35	42,12	0,07	1,17	0,75	8,61	9,76	0,04
<b>15 : 85</b>	11,07					5,07				
<b>10 : 90</b>	28,51	25,46			0,15	5,69	5,03			0,09
<b>5 : 95</b>										

Tab. A-5: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(DEAEMA) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	<b>K<sub>Chloramphenicol</sub></b>				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	1,25	0,29	0,41	0,40	
<b>99 : 1*</b>	0,81	0,38			0,80
<b>95 : 5*</b>	0,33	0,18			0,61
<b>90 : 10</b>	0,21		0,73		0,41
<b>80 : 20</b>	0,20	0,23	1,26	1,54	0,24
<b>70 : 30</b>	0,32		2,60		
<b>60 : 40</b>	0,64	0,52	6,50	6,54	0,15
<b>40 : 60</b>	0,78	0,52	8,57	8,76	0,15
<b>30 : 70</b>	1,95		20,49		
<b>20 : 80</b>	6,98	4,19	52,36	39,18	0,15
<b>15 : 85</b>	14,71		92,49	57,23	
<b>10 : 90</b>	36,14	21,48			0,21
<b>5 : 95</b>	99,43	49,63			

Tab. A-6: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(DEAEMA) unter Verwendung verschiedener mobilen Phase

(v/v)	<b>K<sub>Florfenicol</sub></b>					<b>K<sub>Thiamphenicol</sub></b>				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	0,55	0,05	0,57	0,65		0,85	0,15	0,34	0,41	
<b>99 : 1*</b>	0,35	0,14			0,47	0,54	0,24			0,59
<b>95 : 5*</b>	0,13	0,06			0,29	0,18	0,17			0,44
<b>90 : 10</b>	0,07		0,77		0,19	0,06		0,34		0,30
<b>80 : 20</b>	0,10	0,05	1,07	1,37	0,11	0,00	0,08	0,37	0,61	0,16
<b>70 : 30</b>	0,21		1,95			0,00		0,64		
<b>60 : 40</b>	0,51	0,34	4,57	4,80	0,07	0,05	0,03	1,48	1,69	0,06
<b>40 : 60</b>	0,65	0,36	5,95	6,34	0,08	0,07	0,03	1,86	2,19	0,08
<b>30 : 70</b>	1,64		13,93			0,36		3,98		
<b>20 : 80</b>	5,70	3,17	36,05	28,88	0,13	1,34	0,83	8,92	7,53	0,06
<b>15 : 85</b>	11,76		65,98	42,63		2,60		15,46	10,62	
<b>10 : 90</b>	28,59	16,65			0,24	6,14	4,11			0,11
<b>5 : 95</b>	76,02	40,57				16,40	9,01			

Tab. A-7: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(CAP\_DEAEMA) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

	<b>K<sub>Chloramphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	7,20	0,30	0,58	0,44	
<b>99 : 1*</b>	2,07	0,52			1,06
<b>95 : 5*</b>	0,45	0,42			0,62
<b>90 : 10</b>	0,28		0,88		0,42
<b>80 : 20</b>	0,25	0,25	1,61	1,51	0,28
<b>70 : 30</b>	0,43		3,33		
<b>60 : 40</b>	0,90	0,69	7,17	6,83	0,17
<b>40 : 60</b>	0,77	0,71	9,29	7,90	0,18
<b>30 : 70</b>	2,03		22,32		
<b>20 : 80</b>	7,10	5,77	55,49	41,21	0,18
<b>15 : 85</b>	15,42		89,78	59,23	
<b>10 : 90</b>	37,04	27,32			0,26
<b>5 : 95</b>	103,46	55,61			

Tab. A-8: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(CAP\_DEAEMA) unter Verwendung verschiedener mobiler Phasen

	<b>K<sub>Florfenicol</sub></b>					<b>K<sub>Thiamphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	4,03	0,10	0,76	0,65		5,32	0,21	0,47	0,41	
<b>99 : 1*</b>	1,06	0,22			0,46	1,53	0,38			0,75
<b>95 : 5*</b>	0,15	0,16			0,27	0,24	0,29			0,41
<b>90 : 10</b>	0,10		0,88		0,17	0,10		0,39		0,28
<b>80 : 20</b>	0,11	0,06	1,30	1,36	0,12	0,01	0,04	0,47	0,52	0,16
<b>70 : 30</b>	0,30		2,36			0,03		0,81		
<b>60 : 40</b>	0,70	0,47	4,93	4,99	0,09	0,12	0,03	1,52	1,55	0,08
<b>40 : 60</b>	0,61	0,47	6,22	5,73	0,13	0,11	0,08	1,91	1,76	0,08
<b>30 : 70</b>	1,74		14,58			0,32		3,95		
<b>20 : 80</b>	5,96	4,38	38,67	31,29	0,15	1,29	0,91	9,21	7,52	0,11
<b>15 : 85</b>	12,56		62,64	44,74		2,74		14,21	10,64	
<b>10 : 90</b>	29,70	21,01			0,33	6,42	4,67			0,18
<b>5 : 95</b>	80,51	44,86				16,91	9,53			



Tab. A-9: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	<b>K<sub>Chloramphenicol</sub></b>				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	3,84	0,34	0,52	0,53	
<b>99 : 1*</b>	1,07	0,43			1,66
<b>95 : 5*</b>	0,35	0,43			0,56
<b>90 : 10</b>	0,21		0,88		0,32
<b>80 : 20</b>	0,19	0,29	1,50	1,73	0,21
<b>70 : 30</b>	0,28		2,35		0,15
<b>60 : 40</b>	0,49	0,62	4,89	6,70	0,14
<b>40 : 60</b>	1,07	1,05	8,90	11,25	0,14
<b>30 : 70</b>	2,73		22,00		0,15
<b>20 : 80</b>	9,19	8,50	52,91	44,91	0,19
<b>15 : 85</b>	19,37		107,92	82,35	
<b>10 : 90</b>	44,55	36,79			0,33
<b>5 : 95</b>	109,18	86,68			

Tab. A-10: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phase

(v/v)	<b>K<sub>Florfenicol</sub></b>					<b>K<sub>Thiamphenicol</sub></b>				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	1,74	0,10	0,74	0,79		2,58	0,23	0,46	0,50	
<b>99 : 1*</b>	0,47	0,19			0,68	0,75	0,28			1,12
<b>95 : 5*</b>	0,14	0,18			0,23	0,19	0,28			0,35
<b>90 : 10</b>	0,08		0,94		0,13	0,07		0,47		0,18
<b>80 : 20</b>	0,09	0,15	1,35	1,54	0,07	0,00	0,07	0,58	0,70	0,10
<b>70 : 30</b>	0,20		1,98		0,08	0,01		0,71		0,07
<b>60 : 40</b>	0,40	0,47	3,77	4,92	0,09	0,04	0,09	1,33	1,73	0,06
<b>40 : 60</b>	0,98	0,86	6,80	8,13	0,08	0,16	0,18	2,17	2,55	0,05
<b>30 : 70</b>	2,52		14,97		0,17	0,50		4,14		0,05
<b>20 : 80</b>	8,11	7,01	46,02	34,17	0,19	1,74	1,61	9,83	8,38	0,10
<b>15 : 85</b>	16,57		88,60	61,18		3,60		18,64	15,20	
<b>10 : 90</b>	37,12	29,30			0,42	8,37	6,59			0,25
<b>5 : 95</b>	85,26	71,27				20,48	15,65			

Tab. A-11: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf der stationären Phase P(CAP\_2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

	<b>K<sub>Chloramphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	58,65	0,55	0,72	0,72	
<b>99 : 1*</b>	4,48	0,67			7,01
<b>95 : 5*</b>	0,58	0,57			1,35
<b>90 : 10</b>	0,33		1,25		0,64
<b>80 : 20</b>	0,35	0,42	2,20	2,46	0,34
<b>70 : 30</b>	0,53		3,63		0,20
<b>60 : 40</b>	1,04	1,32	6,10	10,01	0,20
<b>40 : 60</b>	1,16	1,11	10,90	11,62	0,21
<b>30 : 70</b>	2,88		23,67		0,19
<b>20 : 80</b>	9,69	9,55	56,19	50,61	0,25
<b>15 : 85</b>	20,26		109,24	79,89	
<b>10 : 90</b>	46,94	40,40			0,39
<b>5 : 95</b>	111,47	85,79			

Tab. A-12: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Thiamphenicols (1  $\mu\text{mol/ml}$ ; \* 0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf der stationären Phase P(CAP\_2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phase

	<b>K<sub>Florfenicol</sub></b>					<b>K<sub>Thiamphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	21,98	0,21	0,98	1,01		31,76	0,38	0,63	0,66	
<b>99 : 1*</b>	1,89	0,29			3,25	3,18	0,47			4,85
<b>95 : 5*</b>	0,23	0,24			0,58	0,34	0,35			0,90
<b>90 : 10</b>	0,13		1,26		0,27	0,11		0,65		0,40
<b>80 : 20</b>	0,19	0,23	1,80	2,05	0,13	0,02	0,07	0,79	0,92	0,19
<b>70 : 30</b>	0,40		2,62		0,06	0,03		0,98		0,07
<b>60 : 40</b>	0,89	1,00	5,10	6,70	0,13	0,12	0,22	1,99	2,43	0,09
<b>40 : 60</b>	1,02	0,88	6,87	8,15	0,10	0,15	0,16	2,44	2,91	0,09
<b>30 : 70</b>	2,63		15,45		0,11	0,52		4,74		0,07
<b>20 : 80</b>	8,64	7,72	48,49	40,18	0,20	1,43	1,84	11,76	10,27	0,10
<b>15 : 85</b>	17,32		89,15	56,78		3,92		18,81	15,36	
<b>10 : 90</b>	37,41	31,28			0,44	8,47	7,61			0,22
<b>5 : 95</b>	89,77	67,80				20,35	15,59			

## A2. Florfenicol und Thiamphenicol geprägte Polymere

Tab. A-13: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(FF\_2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	K Chloramphenicol				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	8,11	0,21	0,57	0,53	
<b>99 : 1*</b>	5,54	0,38			0,72
<b>95 : 5*</b>	0,36	0,38			0,45
<b>90 : 10</b>	0,24		1,06		0,34
<b>80 : 20</b>	0,23	0,26	1,79	1,85	0,19
<b>70 : 30</b>	0,32		3,43		
<b>60 : 40</b>	0,52	0,56	7,26	6,24	0,09
<b>40 : 60</b>	1,98	1,99	29,97	26,97	0,10
<b>30 : 70</b>	5,37		63,45		
<b>20 : 80</b>	19,63	17,98	131,52	101,28	0,20
<b>15 : 85</b>	42,45	38,47		116,46	
<b>10 : 90</b>	104,38	78,50			0,35
<b>5 : 95</b>					0,45

Tab. A-14: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(FF\_2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phase

(v/v)	K Florfenicol					K Thiamphenicol				
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	3,28	-0,01	0,92	0,82		4,97	0,01	0,51	0,46	
<b>99 : 1*</b>	2,60	0,06			0,01	4,09	0,08			0,02
<b>95 : 5*</b>	0,11	0,12			0,02	0,15	0,21			0,01
<b>90 : 10</b>	0,07		1,19		0,06	0,05		0,52		0,02
<b>80 : 20</b>	0,10	0,08	1,67	1,70	0,05	-0,01	0,02	0,62	0,66	0,03
<b>70 : 30</b>	0,20		2,68			-0,02		0,86		
<b>60 : 40</b>	0,41	0,40	5,49	4,82	0,03	-0,01	0,02	1,68	1,49	0,00
<b>40 : 60</b>	1,83	1,65	21,80	16,96	0,06	0,25	0,30	5,57	4,59	0,01
<b>30 : 70</b>	5,04		43,22			0,85		11,03		
<b>20 : 80</b>	18,05	14,85	100,50	70,91	0,24	3,33	3,08	23,65	15,73	0,12
<b>15 : 85</b>	37,39	31,86				7,14	6,63		16,27	
<b>10 : 90</b>	92,55	64,08			0,48	17,67	13,49			0,25
<b>5 : 95</b>					0,66					0,36

Tab. A-15: Retentionsfaktoren (K) des Chloramphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(TAP\_2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

	<b>K<sub>Chloramphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	MeOH:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN:MeOH
<b>100 : 0*</b>	6,14	0,19	0,41	0,42	
<b>99 : 1*</b>	4,21	0,40			0,58
<b>95 : 5*</b>	0,28	0,28			0,33
<b>90 : 10</b>	0,17		0,84		0,22
<b>80 : 20</b>	0,15	0,18	1,51	1,64	0,12
<b>70 : 30</b>	0,22		3,67		
<b>60 : 40</b>	0,38	0,43	7,12	6,54	0,06
<b>40 : 60</b>	1,65	1,68	28,30	27,64	0,08
<b>30 : 70</b>	4,70		64,56		
<b>20 : 80</b>	17,92	17,78	136,98	119,00	0,18
<b>15 : 85</b>	40,93	42,04		148,00	
<b>10 : 90</b>	103,57	88,87			0,31
<b>5 : 95</b>	308,61				0,41

Tab. A-16: Retentionsfaktoren (K) des Florfenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) und Thiamphenicols (1 µmol/ml; \* 0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P(TAP\_2VPy) unter Verwendung verschiedener mobilen Phase

	<b>K<sub>Florfenicol</sub></b>					<b>K<sub>Thiamphenicol</sub></b>				
(v/v)	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	MeOH: H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	AcN: MeOH
<b>100 : 0*</b>	2,12	0,16	0,68	0,70		3,18	0,19	0,32	0,35	
<b>99 : 1*</b>	2,09	0,17			0,00	2,16	0,18			0,01
<b>95 : 5*</b>	0,06	0,04			-0,02	0,09	0,09			-0,02
<b>90 : 10</b>	0,02		0,94		-0,03	0,01		0,36		-0,03
<b>80 : 20</b>	0,04	0,02	1,35	1,29	-0,02	-0,03	-0,03	0,42	3,12	-0,05
<b>70 : 30</b>	0,12		2,52			-0,07		0,78		
<b>60 : 40</b>	0,27	0,25	5,16	4,12	-0,01	-0,05	-0,02	1,23	2,94	-0,04
<b>40 : 60</b>	1,45	1,35	22,59	18,15	0,05	0,13	0,18	5,43	4,89	0,01
<b>30 : 70</b>	4,26		48,82			0,60		11,24		
<b>20 : 80</b>	16,98	14,94	103,01	95,51	0,19	2,87	2,70	26,73	19,94	0,08
<b>15 : 85</b>	36,58	34,61		111,22		6,39	6,85		26,76	
<b>10 : 90</b>	89,33	72,34			0,40	16,67	13,94			0,21
<b>5 : 95</b>					0,58	51,13				0,30

### A3. Nisin C-terminal analog geprägte Polymere

Tab. A-17: Retentionsfaktoren auf der stationären Phase P( – ) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Gemischen als mobile Phase

AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	K <sub>Nisin</sub> (0,1 µmol/ml)	K <sub>Lys</sub> (10 µmol/ml)	K <sub>Lys-Ala</sub> (1 µmol/ml)	K <sub>Ala-Lys</sub> (1 µmol/ml)
85 : 15		0,82		
80 : 20		0,29	-0,05	0,49
75 : 25		0,08	-0,04	0,17
70 : 30		-0,02	0,01	0,00
20 : 80	1,45	-0,16	-0,14	-0,15
15 : 85	0,99	-0,16	-0,14	-0,15
10 : 90	1,13	-0,15	-0,13	-0,14
5 : 95	1,54	-0,12	-0,16	-0,09

Tab. A-18: Retentionsfaktoren auf der stationären Phase P(Lys) unter Verwendung von verschiedenen mobilen Phasen

(v/v)	K <sub>Nisin</sub> (0,1 µmol/ml)			K <sub>Lysin</sub> (10 µmol/ml)			K <sub>Lys-Ala</sub> (1 µmol/ml)			K <sub>Ala-Lys</sub> (1 µmol/ml)
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH: H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O
100 : 0	–	0,07	0,54	–	-0,45	0,90	–	-0,47	0,91	–
90 : 10	–	-0,53	-0,08	–	-0,36	0,37	–	-0,37	0,14	–
85 : 15				5,03			–			–
80 : 20	–	-0,42	-0,34	3,39	-0,31	0,22	15,50	-0,32	0,05	8,69
75 : 25	–			1,94			6,83			1,52
70 : 30	1,18	-0,41	-0,32	1,09	-0,32	0,17	3,55	-0,33	-0,04	0,81
60 : 40	0,80	-0,43	-0,19	0,48	-0,35	0,15	0,80	-0,35	-0,07	
40 : 60	0,47	-0,45	0,29	0,18	-0,36	0,12	0,31	-0,39	-0,09	
30 : 70	0,49	-0,47	0,33	0,10	-0,34	0,10	0,32	-0,42	0,03	
20 : 80	1,45	-0,48	0,35	-0,19	-0,39	0,09	-0,22	-0,44	0,06	-0,17
15 : 85	2,10			-0,07			0,00			-0,06
10 : 90	2,90	-0,18	0,37	-0,08	-0,44	0,08	-0,42	-0,46	0,24	-0,06
5 : 95	3,46	-0,20	0,38	-0,08			0,02			-0,06

Tab. A-19: Retentionsfaktoren auf der stationären Phase P(Lys-Ala) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Gemischen als mobile Phase

AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	K <sub>Nisin</sub> (0,1 µmol/ml)	K <sub>Lys</sub> (10 µmol/ml)	K <sub>Lys-Ala</sub> (1 µmol/ml)	K <sub>Lys-Ala</sub> (1 µmol/ml)
85 : 15		4,41		
80 : 20		2,01	11,99	8,38
75 : 25		1,00	2,63	1,40
70 : 30		0,54	0,79	0,74
20 : 80	3,25	-0,06	-0,01	-0,06
15 : 85	2,28	-0,04	0,02	-0,03
10 : 90	4,17	-0,07	-0,01	-0,06
5 : 95	4,09	-0,06	0,02	-0,04

Tab. A-20: Retentionsfaktoren auf der stationären Phase P(Lys-Ala-Val) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Gemischen als mobile Phase

AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	K <sub>Nisin</sub> (0,1 µmol/ml)	K <sub>Lys</sub> (10 µmol/ml)	K <sub>Lys-Ala</sub> (1 µmol/ml)	K <sub>Ala-Lys</sub> (1 µmol/ml)
85 : 15		3,70		
80 : 20		1,95	2,46	2,76
75 : 25		0,99	1,38	1,29
70 : 30		0,55	0,80	0,71
20 : 80	3,57	0,07	-0,15	-0,08
15 : 85	7,50	0,03	-0,09	-0,05
10 : 90	13,00	0,03	0,08	0,10
5 : 95	15,60	0,02	0,06	0,10

Tab. A-21: Retentionsfaktoren auf der stationären Phase P(Fmoc-Lys(Fmoc)-Ala-Val) unter Verwendung von Acetonitril/Wasser-Gemischen als mobile Phase

AcN : H <sub>2</sub> O (v/v)	K <sub>Nisin</sub> (0,1 µmol/ml)	K <sub>Lys</sub> (10 µmol/ml)	K <sub>Lys-Ala</sub> (1 µmol/ml)	K <sub>Ala-Lys</sub> (1 µmol/ml)
85 : 15		3,28		
80 : 20		0,79	1,94	1,76
75 : 25		0,50	0,99	0,89
70 : 30		0,33	0,52	0,48
20 : 80	14,81	-0,01	-0,03	-0,01
15 : 85	16,55	-0,02	-0,07	-0,04
10 : 90	18,07	-0,02	-0,02	0,01
5 : 95	21,65	-0,03	-0,04	0,00

## A4. Ala-Gly geprägte Polymere

Tab. A-22: Retentionsfaktoren des Alanins (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Ala-Glys (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf der stationären Phase  $P_B(-)$  unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	$K_{\text{Ala}}$			$K_{\text{Ala-Gly}}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O
<b>100 : 0</b>			0,11			0,12
<b>95 : 5</b>	1,20	-0,25	0,10	1,03	-0,26	0,11
<b>90 : 10</b>	0,83	-0,24	0,09	0,95	-0,27	0,10
<b>85 : 15</b>	0,23	-0,22	0,08	0,55	-0,24	0,10
<b>80 : 20</b>	0,05	-0,20	0,06	0,21	-0,22	0,09
<b>60 : 40</b>	-0,20	-0,27	-0,16	-0,18	-0,29	-0,13
<b>40 : 60</b>	-0,24	-0,28	-0,16	-0,22	-0,29	-0,12
<b>20 : 80</b>	-0,24	-0,29	-0,26	-0,22	-0,30	-0,21

Tab. A-23: Retentionsfaktoren des Fmoc-Alas (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Fmoc-Ala-Glys (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf der stationären Phase  $P_B(-)$  unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	$K_{\text{Fmoc-Ala}}$			$K_{\text{Fmoc-Ala-Gly}}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O
<b>100 : 0</b>	0,44	0,02	-0,39	0,59	0,15	-0,40
<b>95 : 5</b>	0,19	0,05	-0,35	0,51	0,09	-0,38
<b>90 : 10</b>	0,10	-0,02	-0,31	0,21	-0,02	-0,35
<b>80 : 20</b>	0,12	0,07	-0,30	0,10	0,03	-0,35
<b>70 : 30</b>	0,01	0,22	-0,10	-0,10	0,09	-0,26
<b>60 : 40</b>	-0,02	0,61	0,49	-0,17	0,28	-0,16
<b>40 : 60</b>	0,08	1,05	1,72	-0,18	0,54	0,15
<b>30 : 70</b>	0,38	3,78	7,86	0,03	1,77	1,84
<b>25 : 75</b>	1,20	8,40	16,00	0,23	3,76	4,09
<b>20 : 80</b>	2,71	21,58	23,89	0,95	9,13	6,94
<b>15 : 85</b>	4,92			2,45	25,04	12,30
<b>10 : 90</b>	18,07			6,00		

Tab. A-24: Retentionsfaktoren des Alanins (10 µmol/ml) und Ala-Glys (1 µmol/ml) auf der stationären Phase P<sub>B</sub>(Ala-Gly) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	<b>K<sub>Ala</sub></b>			<b>K<sub>Ala-Gly</sub></b>		
	<b>AcN:H<sub>2</sub>O</b>	<b>AcN:H<sub>2</sub>O +0,1%TFA</b>	<b>MeOH:H<sub>2</sub>O</b>	<b>AcN:H<sub>2</sub>O</b>	<b>AcN:H<sub>2</sub>O +0,1%TFA</b>	<b>MeOH:H<sub>2</sub>O</b>
<b>100 : 0</b>			0,18			0,22
<b>95 : 5</b>	3,79	-0,23	0,16	6,50	-0,22	0,18
<b>90 : 10</b>	0,98	-0,25	0,13	1,16	-0,23	0,14
<b>85 : 15</b>	0,23	-0,27	0,02	0,67	-0,28	0,01
<b>80 : 20</b>	-0,07	-0,29	-0,10	0,02	-0,32	-0,12
<b>60 : 40</b>	-0,17	-0,33	-0,18	-0,18	-0,36	-0,14
<b>40 : 60</b>	-0,17	-0,34	-0,19	-0,17	-0,33	-0,17
<b>20 : 80</b>	-0,17	-0,32	-0,24	-0,16	-0,33	-0,23

Tab. A-25: Retentionsfaktoren des Fmoc-Alas (0,1 µmol/ml) und Fmoc-Ala-Glys (0,1 µmol/ml) auf der stationären Phase P<sub>B</sub>(Ala-Gly) unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	<b>K<sub>Fmoc-Ala</sub></b>			<b>K<sub>Fmoc-Ala-Gly</sub></b>		
	<b>AcN:H<sub>2</sub>O</b>	<b>AcN:H<sub>2</sub>O +0,1%TFA</b>	<b>MeOH:H<sub>2</sub>O</b>	<b>AcN:H<sub>2</sub>O</b>	<b>AcN:H<sub>2</sub>O +0,1%TFA</b>	<b>MeOH:H<sub>2</sub>O</b>
<b>100 : 0</b>	0,77	0,02	-0,33	2,87	0,11	-0,36
<b>95 : 5</b>	0,08	0,01	-0,29	0,30	0,04	-0,32
<b>90 : 10</b>	-0,07	-0,02	-0,32	0,09	-0,08	-0,32
<b>80 : 20</b>	-0,06	0,01	-0,27	0,03	-0,01	-0,29
<b>70 : 30</b>	-0,08	0,12	-0,17	-0,12	0,01	-0,22
<b>60 : 40</b>	0,09	0,33	0,05	-0,06	0,13	-0,14
<b>40 : 60</b>	0,03	1,43	1,25	0,01	0,60	0,19
<b>30 : 70</b>	0,60	5,21	7,25	0,00	2,07	1,90
<b>25 : 75</b>	1,00	9,79	13,67	0,37	4,30	3,80
<b>20 : 80</b>	1,70	27,50	32,36	0,72	9,89	7,99
<b>15 : 85</b>	3,77			1,83	30,75	14,23
<b>10 : 90</b>	14,99			5,15		



Tab. A-26: Retentionsfaktoren des Alanins (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Ala-Glys (1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf der stationären Phase  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	$K_{\text{Ala}}$			$K_{\text{Ala-Gly}}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O
<b>100 : 0</b>			0,16			0,14
<b>95 : 5</b>	3,23	-0,20	0,14	5,96	-0,27	0,09
<b>90 : 10</b>	0,45	-0,20	0,12	1,07	-0,26	0,04
<b>85 : 15</b>	0,05	-0,21	0,06	0,23	-0,25	0,02
<b>80 : 20</b>	-0,06	-0,21	0,00	0,01	-0,24	0,00
<b>60 : 40</b>	-0,22	-0,27	-0,09	-0,22	-0,28	-0,03
<b>40 : 60</b>	-0,25	-0,28	-0,14	-0,25	-0,30	-0,10
<b>20 : 80</b>	-0,20	-0,28	-0,25	-0,18	-0,29	-0,20

Tab. A-27: Retentionsfaktoren des Fmoc-Alas (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) und Fmoc-Ala-Glys (0,1  $\mu\text{mol/ml}$ ) auf der stationären Phase  $P_B(\text{Fmoc-Ala-Gly})$  unter Verwendung verschiedener mobilen Phasen

(v/v)	$K_{\text{Fmoc-Ala}}$			$K_{\text{Fmoc-Ala-Gly}}$		
	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O	AcN:H <sub>2</sub> O +0,1%TFA	MeOH:H <sub>2</sub> O
<b>100 : 0</b>	3,29	0,01	-0,29	14,53	0,36	-0,28
<b>95 : 5</b>	0,19	0,04	-0,23	0,43	0,18	-0,25
<b>90 : 10</b>	0,03	0,01	-0,29	-0,01	0,03	-0,24
<b>80 : 20</b>	0,04	0,08	-0,18	-0,11	0,01	-0,22
<b>70 : 30</b>	0,00	0,24	-0,03	-0,21	0,08	-0,17
<b>60 : 40</b>	0,01	0,58	0,16	-0,28	0,26	0,04
<b>40 : 60</b>	0,01	1,57	1,94	-0,32	0,73	0,05
<b>30 : 70</b>	0,52	5,44	9,00	-0,23	2,15	2,21
<b>25 : 75</b>	0,70	10,57	19,42	0,43	4,46	4,33
<b>20 : 80</b>	2,18	27,42	35,05	0,80	10,65	8,33
<b>15 : 85</b>	4,26			1,79	31,04	17,07
<b>10 : 90</b>	19,68			4,63		

# Lebenslauf

---

<b>persönliche Daten</b>	
Name:	Schirmer
Vorname:	Christina
Geburtsdatum:	07.01.1980
Geburtsort:	Magdeburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
<b>Schulbildung</b>	
09/1986 – 09/1991	zehnklassige allgemein bildende polytechnische Oberschule
09/1991 – 07/1998	„Europaschule“ Gymnasium Gommern Abschluss: Abitur
<b>Studium</b>	
Ökotrophologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel	
10/1998 – 02/2001	Grundstudium Abschluss: Vordiplom
02/2001 – 03/2002	Fachrichtungsstudium Ernährungswissenschaften Abschluss: Bachelor of Science
03/2002 – 01/2004	Fachrichtungsstudium Ernährungswissenschaften Abschluss: Master of Science  Masterarbeit an der Bundesanstalt für Milchforschung (Kiel), Institut für Chemie und Technologie der Milch: „Aminosäuregehalt verschiedener Konsummilchen“
<b>wissenschaftliche Tätigkeiten</b>	
06/2003 – 08/2003	Praktikum am Deutsches Institut für Ernährungsforschung (Potsdam-Rehbrücke), Abteilung Interventionsstudien
02/2004 – 07/2007	Anfertigung der Dissertation : „Synthese und Evaluierung molekular geprägter Polymere (MIP) als Sorbentien für lebensmittelanalytische Anwendungen“
02/2004 – z.Zt.	wissenschaftliche Angestellte an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (Standort Kiel), Institut für Chemie und Technologie der Milch

## **Veröffentlichungen**

Schirmer, C., Meisel, H. (2004); Aminosäurezusammensetzung verschiedener Konsummilchen; Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 56 (1): 5 – 23.

Schirmer, C., Meisel, H. (2006); Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey; Journal of Chromatography A 1132: 325 – 328.

Vortrag:

Schirmer, C., Meisel, H.; Aminosäurezusammensetzung verschiedener Konsummilchen; 116. VDLUFA-Kongress; Rostock, 13. – 17.09.2004.

Posterbeitrag:

Schirmer, C., Meisel, H.; Aminosäurezusammensetzung verschiedener Konsummilchen; Milchkonferenz der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft; Kiel, 29. – 30. 2005.